

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**Aislamiento y caracterización**  
**de nuevos genes implicados**  
**en el desarrollo de la**  
**extremidad de vertebrados**

**Tesis doctoral de Clara García Andrés**

Director: Miguel Torres Sánchez

Marzo 2011, Madrid





# Índice

• Summary.....	5
• Introducción.....	9
• Objetivos.....	63
• Materiales y Métodos.....	67
• Resultados.....	79
• Figuras suplementarias.....	127
• Discusión.....	133
• Conclusiones.....	151
• Apéndices.....	155
• Bibliografía.....	161
• Artículos publicados.....	179



# **Summary**



## Summary

Developmental biology is the discipline that studies the mechanisms that transform a single cell known as the zygote in a multicellular complex organism.

Identifying such mechanisms in the whole embryo is quite complicated, so we chose the vertebrate limb as a model to look into the molecules that run this process.

The appendages have several advantages in comparison with other structures: they can be manipulated without compromising embryo viability; its signalling events are similar to the ones that operate in the rest of the body and are conserved through evolution.

In this thesis we have used mice and chicken embryos to look for novel genes implicated in vertebrate limb patterning. For that purpose, we performed a microarray experiment with mesenchyme cells taken from the distal part of a mouse limb bud at different stages. This part of the mesenchyme is composed of undifferentiated cells and gives rise to all the skeletal elements and connective tissue of the limb; it is known that some proximo-distal markers (patterning genes) are differentially expressed in this region at different developmental points.

The results of the experiment revealed that 250 genes have a significant expression in the limb among which we selected 167 candidates with a more dynamic profile; from this group we picked 30 to analyse them by in situ Hybridization. All these genes showed a remarkable and dynamic expression in the vertebrate limb and, in most of the cases, their function had not been described in the literature previously, so we decided to choose two candidates to carry out a functional study.

The first gene we wanted to investigate encodes a secreted protein called CXCL14, which belongs to the chemokine family. These set of proteins enclose a group of small basic signalling factors of the Immune system classically associated with leukocyte trafficking.

In the recent years just the chemokine SDF1 and its receptor CXCR4 has been known to have a role in different processes during embryogenesis in addition of their function in the immune System. Furthermore, both, ligand and receptor are expressed in the limb bud mesenchyme and are important for the patterning and survival of muscle precursors.

Interestingly, our experiments showed that *SDF1* and *CXCL14* have complementary expression domains, since the first one is found in the central mesenchyme of the limb bud, while *CXCL14* is expressed in the ectoderm and in two subectodermic mesenchyme populations. Furthermore, in the chicken embryo the expression of these chemokines is complementary not only in the limb, but also in many other tissues. Its high conservation along evolution, its specific expression in the embryo, and a putative functional interaction with SDF1, prompted us to study CXCL14 during limb development.

Previous studies had demonstrated an essential role of the ectoderm in the maintenance of limb bud mesenchyme populations. To address CXCL14 function in limb ectoderm we made gain of function studies in the chicken embryo. For this purpose we electroporated a plasmid with *CXCL14* coding sequence in the limb mesenchyme and analysed mesenchyme populations like muscle and tendon precursors. The conclusions are that CXCL14 by itself it is not able to modify muscle and tendon markers, such as *Pax3* and *Scleraxis*, respectively.

The ectoderm has also been involved in the maintenance of the avascular zone, which lies right underneath it. Taking into account that CXCL14 can function as an angiogenesis inhibitor in other systems, we decided to look for any change of the vasculature after the electroporation, using the technique of ink injection in the viteline arteries. In spite of good electroporation efficiency, we could not see a significant difference between the specimens electroporated with the plasmid carrying the chemokine and the electroporation with the empty plasmid.

The second gene that we selected from the Microarray experiment encoded a transcription factor called *Prdm16*, which contains a PR-protein-protein interaction domain homologue to the SET domain of *Drosophila melanogaster*, involved in chromatin remodelling. We demonstrated that this gene is expressed specifically throughout the whole limb mesenchyme and its expression starts before limb induction in the lateral plate mesoderm.

To test the function of this gene in the vertebrate limb, we analysed the phenotype of a *Prdm16* gene-trap line which abolishes protein production. These mice die at birth and present different skeletal defects and defects in the aortic arch arterial tree. Among the skeletal anomalies, we focused our attention on the clavicle truncation. This bone has some peculiarities that make it really interesting: first, it is the first to ossify along with the dentary of the mandible, and second, it contains the two types of ossification, membranous in the lateral part and endochondral in its medial region. Skeletal staining of cartilage and bone using Alcian blue and Alizarin red reagents, respectively, and cartilage and bone riboprobes, allowed us to study the histogenesis of this poorly studied bone. Strikingly, staining of the mutant embryos showed that *Prdm16*<sup>-/-</sup> are not able to develop the medial part of the clavicle, which grows by endochondral ossification, while the membranous part of the clavicle is spared. This phenotype is unique and will help to understand the developmental origins of the clavicle and the understanding of congenital clavicle hypoplasias in man.

# **Introducción**





## 1. La biología del desarrollo

La biología del desarrollo es la ciencia que estudia los mecanismos por los cuales el cigoto, una estructura unicelular, es capaz de convertirse en un ser pluricelular complejo con un patrón tridimensional bien organizado. El camino desde la fertilización al organismo adulto engloba varios procesos:

Diferenciación celular: mecanismo por el cual dos células iguales van adquiriendo características distintas gracias a la activación diferencial de determinados genes en distintos momentos del desarrollo.

Crecimiento del número de células: el tamaño del organismo se define mediante un balance entre la división y la muerte celular. Estas dos funciones celulares tienen que estar finamente reguladas para asegurar una correcta morfogénesis de los órganos y estructuras corporales, lo cual incide directamente en su funcionalidad.

Morfogénesis: esta palabra significa “generación de forma”. Por tanto, como su nombre indica se refiere a la colocación estructurada de las células para formar los distintos órganos y tejidos.

Las bases moleculares del desarrollo, históricamente y por razones prácticas, han sido mejor caracterizadas en modelos animales de invertebrados como la mosca *Drosophila melanogaster* y el gusano *Caenorhabditis elegans*.

No obstante, el avance en el conocimiento de modelos de desarrollo de vertebrados es creciente y necesario ya que existen múltiples enfermedades congénitas en el ser humano que afectan a alguna fase del desarrollo embrionario.

El desarrollo de las extremidades en artrópodos y tetrápodos representa un modelo excelente de generación y formación de patrón en una estructura secundaria, y ha sido intensamente estudiado por tener grandes ventajas en comparación con otras estructuras. Desde un punto de vista técnico, el *limb bud* (primordio de la extremidad) es fácilmente manipulable sin que ello interfiera con la vida del organismo, lo que permite hacer experimentos de función y regulación génica “in vivo”. Otra de las ventajas es que las moléculas implicadas en la morfogénesis de la extremidad también operan en la formación de patrón de otras partes del cuerpo y lo que es más importante, están conservadas entre vertebrados y a lo largo de la evolución.

En esta tesis doctoral hemos utilizado pollo y ratón como modelos animales de desarrollo de vertebrados; cada uno con sus ventajas e inconvenientes permiten abordar las cuestiones fundamentales del desarrollo embrionario desde diferentes perspectivas. Se ha utilizado el embrión de pollo para abordajes funcionales de ganancia de función, ya que su desarrollo independiente de la madre, facilita la manipulación del embrión pudiendo controlar eficazmente la ventana espacio-temporal. Por el contrario, el embrión de ratón, tiene la ventaja de ser un organismo modificable genéticamente, y gracias al avance de la ingeniería genética y a la aplicación de determinadas drogas, estas modificaciones son cada vez más controlables en el espacio y en el tiempo. Además, la manipulación génica del ratón es importante para la generación de modelos animales de enfermedades humanas, por ser esta una especie más cercana al ser humano que el pollo.

## **2. Desarrollo de la extremidad de vertebrados**

### **2. 1. Establecimiento del campo de la extremidad en el eje Antero-Posterior del embrión**

El campo de la extremidad se define como el conjunto de células con potencialidad para formar una extremidad cuando son transplantadas a un sitio ectópico del embrión. En vertebrados, estas células se localizan en sitios específicos en la placa lateral mesodérmica ó somatopleura, mesodermo más lateral que subyace al ectodermo dorsal del embrión.

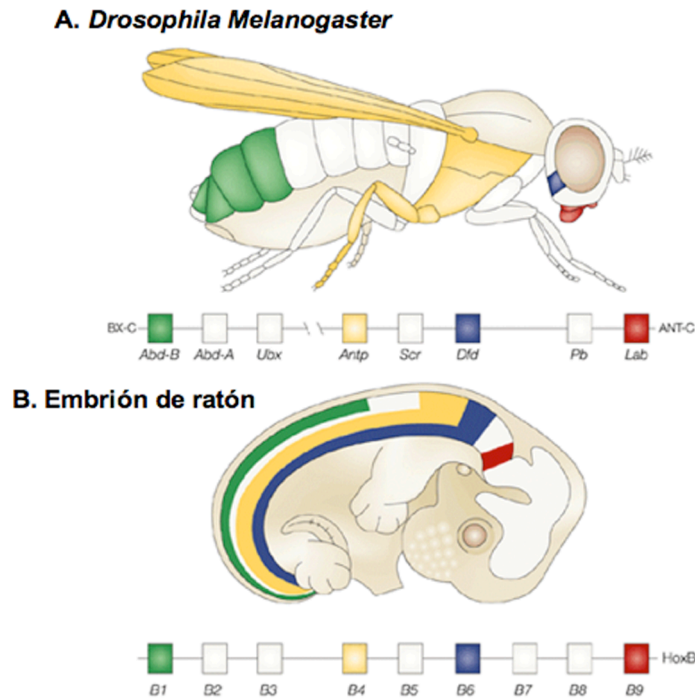
El primer paso para el establecimiento del campo de la extremidad es la determinación de la región dentro del eje antero-posterior del embrión donde van a estar localizadas, es decir, donde quedará fijada la zona prospectiva de la extremidad. En el reino animal la especificación y regionalización dentro del eje AP del cuerpo se lleva a cabo por los genes *Hox*, factores de transcripción de tipo homeodominio, cuyos bordes de expresión a lo largo del tronco marcan la aparición de distintas estructuras dentro de este eje. Los vertebrados tienen 4 grupos de genes *Hox*, *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* y *HoxD* dispuestos en distintos cromosomas, y cuyo orden dentro del genoma guarda correlación con el orden espacio-temporal en el que se expresan a lo largo del cuerpo. Esta propiedad se denomina colinearidad y consiste en que los genes que se encuentren en el extremo 3' del grupo, se expresarán en la parte anterior del cuerpo, mientras que los que estén en el extremo 5' lo harán en segmentos más posteriores del mismo (colinearidad espacial); así mismo, los primeros en el grupo se expresarán más tempranamente en el desarrollo que los segundos (colinearidad temporal) (Pearson et al., 2005).

Las mutaciones en varios de estos genes producen las llamadas transformaciones homeóticas, donde un segmento toma la apariencia de otro más posterior o más anterior (Carroll, 1995)

Existen bastantes evidencias de que la combinación de algunos de estos genes podría ser determinante en el posicionamiento A-P del campo de la extremidad. Un ejemplo se halla en la expresión de los genes *Hoxc6*, *Hoxc8* y *Hoxb5*, cuyo límite anterior de expresión se encuentra justo al nivel de la extremidad anterior. Una prueba funcional de esta hipótesis es la traslocación de la cintura escapular observada en los mutantes de *Hoxb5* (Rancourt et al., 1995). En general, los cambios de posición de las extremidades conllevan cambios de la expresión de los genes *Hox*. (Cohn et al., 1997; Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001)

La expresión de los genes *Hox* en el eje AP está regulada por la actividad del ácido retinoico (RA) un derivado de la vitamina A, que se expresa en el mesodermo más caudal formando un gradiente decreciente desde caudal a rostral. La alteración por exceso o por defecto de la actividad del RA provoca una expresión anómala de los genes *Hox*, y como consecuencia cambios de posición de estructuras axiales (Kessel and Gruss, 1991; Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001).

**Fig. 1**



Ref: *Nature Reviews Cancer* 2, 777-785 (Octubre 2002)

**Fig. 1\_ Colinearidad de los genes Hox:** tanto en *Drosophila* como en vertebrados, los genes Hox localizados en el extremo 5' (derecha) dentro del grupo, se expresan en regiones más posteriores del embrión; los que se expresan en el extremo 3' (izquierda) se expresan en zonas más anteriores.

## **2. 2. Inducción del primordio de la extremidad**

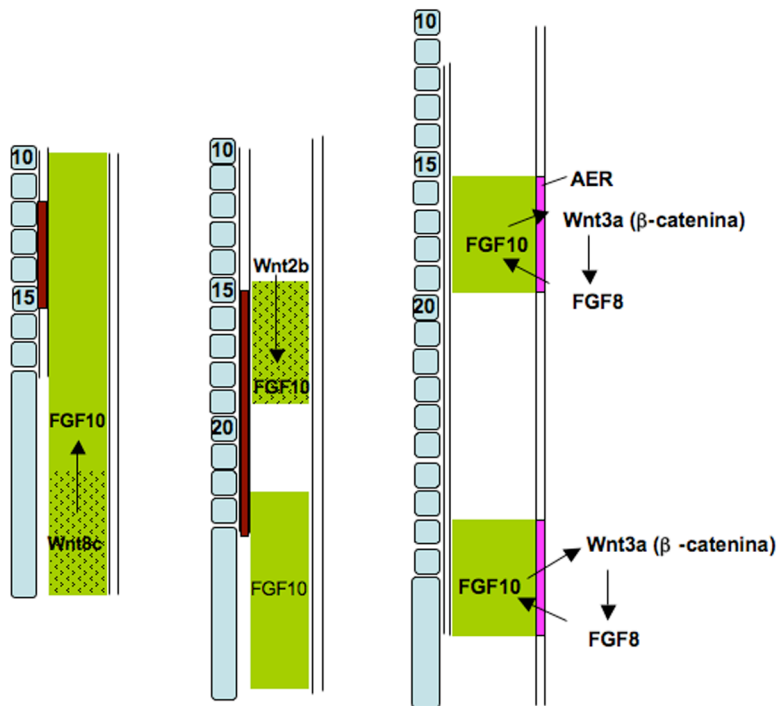
Una vez se ha fijado el campo de la extremidad, señales difusibles provocan la proliferación diferencial de una parte del mesodermo del flanco para dar el esbozo de la extremidad. Esta inducción implica una señalización entre mesénquima y ectodermo llevada a cabo por varios factores entre los cuales juegan un papel esencial miembros de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs). La señalización ectodérmica estimula el reclutamiento y la proliferación de las células mesenquimales que forman una protrusión cubierta por una capa de ectodermo, estructura que conocemos como el primordio de la extremidad, visible desde 17HH en el embrión de pollo y E9-9,25 en el embrión de ratón.

El primer factor FGF expresado en el desarrollo de la extremidad es *Fgf10*, que se expresa en una región amplia de la placa lateral mesodérmica y en el momento de la inducción (14HH) se restringe a la zona prospectiva de la extremidad. La interacción de FGF10 con el ectodermo induce la formación de un epitelio especializado denominado *Apical Ectodermal Ridge* (AER) y que constituye un centro de señalización esencial para el crecimiento del primordio de la extremidad. Ratones mutantes tanto para el gen *Fgf10* como para su receptor *Fgfr2*, no son capaces de formar

extremidades (Min et al., 1998; Xu et al., 1998; Sekine et al., 1999). La expresión de *Fgf10* es inducida por *Wnt2b*, el cual se expresa en los somitos, en el mesodermo intermedio y en la placa lateral mesodérmica (LPM) a la altura de la futura extremidad. En el campo de la extremidad posterior, *Fgf10* se expresa gracias a la señalización de *Wnt8c*; tanto *Wnt2b* como *Wnt8c* actúan a través de la ruta canónica de la  $\beta$ -catenina y su expresión ectópica en el flanco es capaz de inducir una extremidad (Kawakami et al., 2001). Se postula que existen otros factores que disparan la expresión de *Wnt2b* y *Wnt8c* procedentes del mesodermo intermedio; *Fgf8* podría ser un buen candidato ya que su expresión en el IM es consistente con este modelo. A pesar de que bastantes experimentos clásicos apoyan esta hipótesis, la ablación genética de este factor en el IM realizada recientemente por varios grupos parece descartar esta posibilidad (Boulet et al., 2004)

En el embrión de ratón no se han identificado los factores difusibles responsables de la inducción de *Fgf10* en la LPM, pero si se ha determinado que *Tbx5* precede a *Fgf10* y es necesario para su expresión en el mesodermo prospectivo de la extremidad anterior (Rallis et al., 2003; Agarwal, 2003), mientras que *Tbx4* realiza la misma función en la extremidad posterior (Naiche and Papaioannou, 2003)

**Fig. 2**



**Fig. 2 Inducción de la extremidad**

*Wnt8c* y *Wnt2b* (áreas punteadas) fijan la expresión de *Fgf10* en las zonas de la placa lateral donde van a surgir la extremidades anterior y posterior, respectivamente. El bucle de activación *Fgf10-Fgf8* entre mesénquima y ectodermo permite la proliferación de células mesenquimales en las zonas prospectivas de la extremidad.

## 2. 3. Crecimiento y formación de patrón del eje proximo-distal

### 2. 3. 1. El AER: principal centro de señalización del eje proximo-distal

El crecimiento de la extremidad en el eje proximo-distal, es posible gracias a la interacción del AER (*Apical Ectodermal Ridge*) con el mesénquima subyacente. Éste es un epitelio especializado situado en la interfase dorso-ventral de la

extremidad, que funciona como un centro de señalización promoviendo el crecimiento de una masa de células indiferenciadas del mesénquima distal situada 300 micras por debajo de este epitelio. Estas células se diferencian progresivamente en una secuencia P-D hasta dar lugar a todos los elementos esqueléticos de la extremidad.

### **2. 3. 1. 1. Inducción del AER**

El factor desencadenante de la inducción de los precursores del AER en el ectodermo es el *Fgf10* proveniente del mesénquima subyacente. Éste actúa a través de los factores Wnt3a (Narita et al., 2007), en el caso del pollo, y Wnt3 (Barrow et al., 2003), en el caso del ratón, los cuales a su vez *activarán Fgf8* en el ectodermo por la vía canónica de Wnt/B-catenina. Estos factores son capaces de inducir extremidades ectópicas si se sobreexpresan en el flanco del embrión (Kawakami et al., 2001).

A su vez el FGF8 mantiene la expresión de *Fgf10* en el mesénquima subyacente, con lo que se genera un bucle de retroalimentación positiva que permite la permanente proliferación de las células del mesénquima y por tanto el crecimiento de la extremidad.

Se ha demostrado que proteínas de la familia de las BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) son esenciales en el proceso de inducción del AER, ya que ratones que carecen del receptor 1A de BMPs (*Bmpr1A*) no pueden formar esta estructura (Pizette and Niswander, 1999; Ahn et al., 2001). Esta función de las BMPs está mediada por la vía de Wnt/B-catenina, evidencian mutantes de ganancia de función de esta vía que rescatan el fenotipo de fallo en la inducción del AER en los mutantes de *Bmpr1* (Soshnikova et al., 2003).

### **2. 3. 1. 2. Estructura del AER**

El AER es un epitelio pseudoestratificado en el pollo y poliestratificado en el ratón que se sitúa a lo largo del eje antero-posterior (AP), en la interfase entre ectodermo dorsal y ventral. Es una estructura transitoria existente únicamente en la etapa embrionaria, cuyos precursores se originan en el ectodermo ventral alrededor de E9 en el ratón (Bell et al., 1998; Loomis et al., 1998; Martin, 1998); a E10,5-E11 ya se observa un AER maduro de tres a cuatro capas de células en la interfase dorso-ventral. En el pollo los precursores del AER aparecen sobre 17HH tanto en el ectodermo ventral como dorsal y adoptan su típica estructura de epitelio pseudoestratificado en el extremo distal de la extremidad a HH20. Este centro de señalización no desaparece hasta que no se ha formado la última falange de cada dígito (Fernandez-Teran and Ros, 2008)

El AER maduro forma una cresta en la interfase dorso-ventral cuya altura varía en el eje AP, siendo más pronunciada en la parte posterior, donde existe un crecimiento más activo del mesénquima subyacente (Saunders, 1948).

La existencia de AER se considera equivalente a la expresión de *Fgf8* en el ectodermo del primordio de la extremidad, ya que este factor, además de ser esencial para la función de este centro de señalización, se localiza en esta estructura en todas sus fases: Inducción, maduración, mantenimiento y regresión.

### **2. 3. 1. 3. Posicionamiento del AER**

Existen múltiples evidencias de que la formación del borde dorso-ventral está directamente relacionada con la inducción del AER y su posicionamiento en la interfase dorso-ventral. Ejemplo de ello es que los mutantes que tienen alterado el patrón dorso-ventral también tienen defectos en la formación de esta estructura (Grieshammer et al., 1996; Ros et al.,

1996; Bell et al., 1998). Otra evidencia de esto es que la yuxtaposición de un ectodermo dorsal con un ectodermo ventral es capaz de inducir un AER (Laufer et al., 1997; Tanaka et al., 1997).

Tanto en pollo como en ratón estudios de trazado de linaje han demostrado la existencia de compartimentos en el ectodermo implicados en la localización y morfogénesis del AER (Altabef et al., 1997; Michaud et al., 1997; Kimmel et al., 2000). No obstante, los bordes de estos compartimentos parecen ser diferentes en las dos especies; en los experimentos llevados a cabo en pollo, existen dos compartimentos, uno ventral y otro dorsal que convergen en el margen distal donde se forma el AER; en este caso el AER está constituido tanto por células del ectodermo dorsal como por células del ectodermo ventral (Altabef et al., 1997; Michaud et al., 1997). En estudios en ratón donde el trazado de linaje se hace mediante marcaje genético se han determinado tres bordes de compartimento dinámicos a lo largo del desarrollo; en los estadios de pre-AER, cuando todavía no se ha establecido la cresta madura en la interfase dorso-ventral, existe un compartimento dorsal que llega hasta la expresión distal de *Wnt7a* (marcador del ectodermo dorsal del que hablaremos más adelante), y otro ventral que llega hasta la mitad ventral del pre-AER, marcado por la expresión del factor de transcripción *En-1*. Al contrario que en el pollo, todas las células comprometidas a formar el AER provienen del ectodermo ventral y primero se encontrarán con una restricción del borde dorsal y luego con una restricción del borde que recorre la línea media del AER durante su morfogénesis. Cuando el AER se va compactando, se genera un tercer borde de compartimento entre el AER y el ectodermo ventral; las células que se quedan en el ectodermo ventral en este momento dejan de expresar marcadores de AER y no se incorporan a la cresta apical. A partir de E11,5, las células del AER dorsal se mezclan con las del AER ventral, coincidiendo con el inicio de la degeneración de esta estructura (Kimmel et al., 2000). No obstante, a pesar de que se conocen algunos factores implicados en la polaridad dorso-ventral, como son *Wnt7a*, que se expresa en el ectodermo dorsal y *Engrailed1* (*En1*) expresado en el ectodermo ventral del esbozo de la extremidad, no se conocen los factores que especifican los dos compartimentos anteriormente mencionados, ya que mutantes dobles de *Wnt7a* y *En1* tienen un AER prácticamente normal (Loomis et al., 1998; Kimmel et al., 2000). A pesar de esto, estudios de ganancia de función y de falta de función de *En-1* indican que la señalización de este factor de transcripción entre estos bordes, es importante para la correcta localización de las células del AER en la interfase dorso-ventral (Loomis et al., 1998; Kimmel et al., 2000).

Se hipotetiza que el borde dorso-ventral que indica el posicionamiento del AER podría venir marcado por un borde de actividad de BMPs, proteínas que inducen la expresión de *En1* en el ectodermo ventral (Fernandez-Teran and Ros, 2008).

Existen otros genes implicados en la localización del AER en la interfase dorso-ventral como es el caso del gen *Radical fringe*, que codifica para una proteína con actividad glicosiltransferasa, y que es homólogo al gen *Fringe* de *Drosophila*, cuya función es establecer correctamente el margen del disco imaginal del ala de la mosca, que al igual que el AER funciona como un centro de señalización (Kim et al., 1995). La expresión del gen *R-fringe* está restringida al ectodermo dorsal del primordio de la extremidad gracias a la inhibición de este gen en el ectodermo ventral por la actividad del factor *En1*. La sobreexpresión del gen *R-fringe* en el ectodermo ventral del embrión de pollo provoca tanto AERs desestructurados como deslocalizados. No obstante estos fenotipos no tienen alterada la especificación dorso-ventral (Laufer et al., 1997; Rodríguez-Esteban et al., 1997). A pesar de estos resultados prometedores, los ratones que carecen de este gen no presentan ninguna alteración en el AER y por tanto sigue siendo controvertido el papel de esta proteína (Moran et al., 1999).

#### **2. 3. 1. 4. Maduración y mantenimiento del AER**

La maduración del AER es el proceso mediante el cual los precursores de este epitelio, que inicialmente ocupan un dominio más amplio en el ectodermo (en el ectodermo dorsal y ventral en pollo, y sólo en el ectodermo ventral en ratón), se reorganizan y compactan en la interfase dorso ventral de la extremidad formando un epitelio especializado.

Existen varios mutantes que tienen afectado el mecanismo de maduración del AER. Los ratones deficientes para el factor de transcripción En-1, por ejemplo, poseen un AER desestructurado extendido ventralmente, y bifurcado en la parte anterior de la extremidad, donde en algunos casos también se forman AERs secundarios; este fenotipo viene ligado a la expresión ectópica de *Wnt7a* en el ectodermo ventral, por lo que se postula que las células inician un proceso de compactación similar al de la interfase dorso-ventral (Loomis et al., 1998; Fernandez-Teran and Ros, 2008).

Otro factor implicado en este proceso es el factor de transcripción Sp8, homólogo del gen *Buttonhead* de *Drosophila*; Los ratones que carecen de este factor son capaces de inducir un pre-AER, pero este no se compacta en la interfase dorso-ventral para formar la cresta apical (Bell et al., 2003; Treichel et al., 2003).

Una vez formado, el AER necesita una continua señalización del mesénquima para **mantener** su estructura y funcionalidad. FGF10, es uno de los factores mesenquimales clave para la supervivencia del AER; Este induce la expresión del gen *Sp8*, que codifica para un factor de transcripción tipo dedo de zinc (*zinc finger*) homólogo al factor *buttonhead* de *Drosophila*, en las células precursoras del AER, el cual, a su vez, mantiene la expresión de *Fgf8* en esta estructura. En ausencia de la actividad de Sp8, se induce la expresión de *Fgf8* pero se acaba perdiendo con el tiempo (Kawakami et al., 2004).

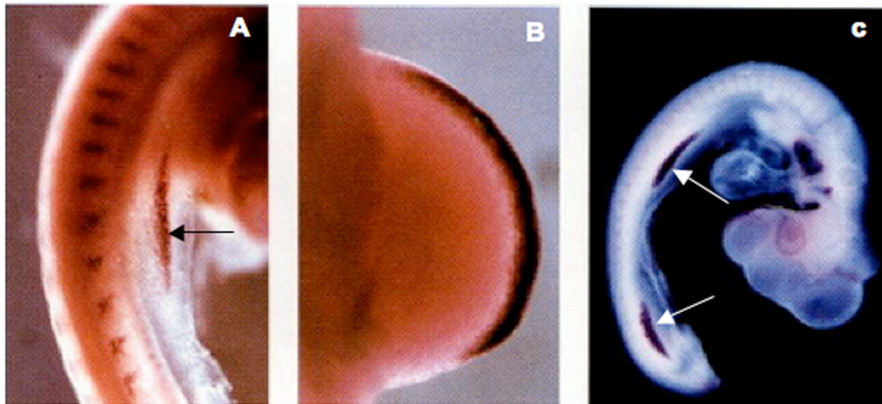
Existen otras rutas de señalización implicadas en este proceso, que a su vez regulan el crecimiento coordinado de los tres ejes de la extremidad y por ello se hablará de ellas en detalle más adelante.

#### **2. 3. 1. 5 Regresión del AER**

Una vez finalizado el crecimiento de los elementos esqueléticos la estructura y señalización del AER degenera y desaparece.

Experimentos de sobreexpresión de Noggin, un antagonista de BMPs, en los que el AER permanece por más tiempo, llevaron a la conclusión de que las BMPs promueven la regresión de este centro de señalización (Pizette and Niswander, 1999; Guha et al., 2002; Fernandez-Teran and Ros, 2008). Esto ha sido confirmado en estudios más recientes donde la supresión de la actividad de las BMPs, mediante la ablación genética del receptor *Bmpr1A* en el AER alarga la vida de éste e impide la apoptosis interdigital; este fenotipo va ligado a un aumento de la expresión de *Fgf8*, por lo que parece que el efecto sobre los interdígitos está mediado por los FGFs de AER. En relación con esto, el rescate de las sindactilias provocadas por la ausencia de BMPs al quitar también FGF8 y FGF4, confirma esta hipótesis (Pajni-Underwood et al., 2007). La señalización de las BMPs sobre el AER parece provenir tanto del mesénquima como del propio AER (Ganan et al., 1996; Guha et al., 2002; Selever et al., 2004; Wang et al., 2004; Bandyopadhyay et al., 2006; Fernandez-Teran and Ros, 2008), lo cual tiene sentido si se tiene en cuenta que la regresión se produce antes en los interdígitos donde existen altos niveles de BMPs.

**Fig. 3**



Ref: A: J. C. Izpisua Belmonte; C: A. López Martínez and J. F. Fallon;  
Imagen reproducida del Gilbert S. F. 7ª edición

**Fig. 3\_ Expresión de FGF8 en el AER de un embrión de pollo**

**A:** Esbozo de una extremidad de 16HH; la flecha marca los precursores del AER.

**B:** Extremidad de 21HH.

**C:** Embrión de 16HH; las flechas marcan los precursores del AER.

### **2. 3. 1. 6. Función del AER**

Los primeros experimentos que demostraron que el AER era una estructura esencial para la formación de los distintos elementos esqueléticos en el eje proximo-distal fueron realizados por John Saunders en 1948 (Saunders, 1948). Éste extirpó el AER a distintos estadios del desarrollo del esbozo de la extremidad, obteniendo truncaciones cada vez más distales cuanto más tardío era el estadio; cuando retiraba el AER a 19HH, sólo se formaba el elemento más proximal (estilopodio); si realizaba la operación a 21HH, obtenía estilopodio y zeugopodio, mientras que si lo hacía a 24HH, obtenía los elementos de la muñeca, pero no los dígitos; la ablación del AER a 25HH daba una extremidad completa (Saunders, 1948; Summerbell et al., 1973). Estos experimentos demostraban que el AER era esencial para el crecimiento proximo-distal de la extremidad. No obstante, años más tarde se constató que la señal del AER tenía que ser sólo permisiva ya que trasplantes de AER “viejo” a un mesénquima temparano y un AER temparano a un mesénquima más avanzado no tenían ningún efecto sobre el mesénquima (Rubin and Saunders, 1972).

Posteriormente, en el año 1979 Wolpert y colaboradores trataron con rayos X alas de embriones de pollo de 21HH induciendo de esa manera muerte celular en el mesénquima de éstas. El resultado fue la truncación del elemento más proximal de la extremidad, lo cual, junto con los experimentos de ablación del AER, inspiró la elaboración del **“modelo de la zona de progreso”**.

Este modelo postulaba que las células adquieren una información posicional tanto más distal cuánto más tiempo pasan en la “zona de progreso”, zona de mesénquima indiferenciado de un grosor aproximado de 300 micras localizada debajo del AER, el cual mantiene estas células en un estado indiferenciado. La zona de progreso posee un tamaño constante, de modo que según la extremidad vaya creciendo, algunas de estas células se verán desplazadas fuera de la zona de progreso y comenzarán su diferenciación. La diferenciación se produce en un gradiente proximo-distal, diferenciándose primero los elementos proximales de la extremidad (estilopodio; húmero), luego los elementos mediales (zeugopodio; radio, ulna) y por último los elementos más distales (Autopodio; carpales, metacarpales y dígitos). Con este modelo se justificaban los experimentos de irradiación con rayos x, en los que la pérdida del elemento proximal se podía explicar



por una distalización de las células de la zona de progreso que habían pasado más tiempo en esta región para compensar la depleción celular debida a la radiación.

En el modelo de la Zona de Progreso, por tanto, la especificación de los distintos segmentos de la extremidad no viene dada por señales instructivas, sino por un reloj autónomo que cuenta el tiempo que las células pasan en la zona de progreso. Al retirar el AER, el reloj se pararía y las células de la zona de progreso contribuirían al elemento proximo-distal correspondiente al nivel de especificación proximo-distal que se hubiera alcanzado hasta ese momento.

La autonomía de las células especificadas frente a un modelo de morfógeno fue validada al comprobar que transplantes de células de la zona de progreso a un embrión huésped retenían sus destinos originales.

A pesar de su actual cuestionamiento, este modelo fue aceptado durante 30 años de investigación en el campo de la extremidad.

### **2. 3. 1. 6. 1 Los factores de crecimiento de fibroblastos median la función del AER**

En los años 90, se descubrió que la función esencial del AER en el crecimiento de la extremidad venía mediada por algunos miembros de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) (Niswander et al., 1993). *Fgf8*, *Fgf4*, *Fgf9* y *Fgf17* muestran una expresión restringida en el AER tanto en pollo como en ratón, aunque en pollo también se expresan *Fgf2* y *Fgf19*. Mientras *Fgf4*, *Fgf9* y *Fgf17* tienen una ventana espacio-temporal más reducida y su expresión se restringe fundamentalmente a la parte posterior del AER, *Fgf8* se expresa a lo largo de todo el eje AP y durante toda la vida del AER, desde las células precursoras hasta la regresión de esta estructura (Bell et al., 1998; Loomis et al., 1998; Martin, 1998).

La demostración de que los FGFs eran responsables de la función del AER se consiguió tras comprobar que la colocación de bolas impregnadas con estos factores podían rescatar las truncaciones vistas por Saunders tras la ablación del AER (Niswander et al., 1993; Fallon et al., 1994). Se vio que no sólo rescataban el crecimiento de las células mesenquimales sino que evitaban la muerte celular derivada de la pérdida del AER y por lo tanto se constató su importancia en la proliferación y supervivencia del mesénquima subyacente.

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los descubrimientos más reveladores, fue que la administración de FGFs en la región del flanco entre las dos extremidades, generaba una extremidad nueva (Cohn et al., 1995).

### **2. 3. 2. La era molecular y la aparición de nuevos modelos de especificación proximo-distal**

En la década de los 90, el avance de la genética molecular permitió la interrupción de la función de los FGFs y otros genes implicados en el desarrollo de la extremidad mediante ingeniería genética en el modelo de ratón, lo cual dio paso a la era molecular en este campo de la biología del desarrollo. Los experimentos de falta de función en el ratón generaron una gran cantidad de fenotipos difícilmente interpretables sólo con el modelo de la zona de progreso.

#### **2. 3. 2. 1. Mutantes de FGFs: Modelo de especificación temprana**

Experimentos de falta de función de los tres FGFs con una expresión más posterior en el AER, *Fgf4*, *Fgf9* y *Fgf17* revelaron que la interrupción de estos genes no comprometía el desarrollo de la extremidad, mientras que la inactivación

del gen *Fgf8* provocaba la pérdida del húmero, radio y del primer dedo (Lewandoski et al., 2000; Moon and Capecchi, 2000). La sobreexpresión del gen *Fgf4* en el mutante de *Fgf8* era capaz de rescatar el desarrollo de la extremidad, lo cual demostraba que los FGFs tienen la misma función pero su contribución al desarrollo de la extremidad es distinta (Lu et al., 2006). La pérdida del húmero en el mutante de *Fgf8* era difícilmente reconciliable con el modelo de la zona de progreso pues, al no haber muerte celular distal, no se podía argumentar una mayor permanencia de las células supervivientes en la zona de progreso por una proliferación compensatoria como en el caso de los experimentos de radiación con rayos X (Wolpert, 1969).

A pesar de que la mutación del *Fgf4* no daba ningún fenotipo, el doble *knock-out* de *Fgf8* y *Fgf4*, tenía un fenotipo más severo que el del mutante de *Fgf8*. En este caso, la doble interrupción se realizó utilizando una línea *Cre* bajo el promotor de *Msx2*; debido a la cinética de *Msx2* y *Fgf8*, en el mutante, los dos genes se expresan de forma transitoria en la extremidad anterior mientras que nunca se activan en la extremidad posterior. En el primer caso el fenotipo muestra una hipoplasia de los tres elementos proximo-distales, mientras en el segundo caso no se llega a formar ninguna condensación cartilaginosa, demostrando que estos dos miembros de la familia de los FGF son los que más contribuyen al crecimiento de la extremidad (Sun et al., 2002).

Estos fenotipos no encajaban en el modelo de la zona de progreso que defendía una progresividad en la especificación proximo-distal y cuya predicción hubiera sido una truncación a nivel del estilopodio/zeugopodio.

Con el objeto de explicar estos experimentos y apoyado en otras observaciones incompatibles con el viejo modelo, surgió la idea del “**modelo de especificación temprana**” (*Early specification model*) el cual propone que en el esbozo temprano de la extremidad ya existen los precursores de los tres segmentos del eje PD (Dudley et al., 2002). Estos investigadores argumentaban que las truncaciones observadas tras la ablación del AER podían ser debidas a la muerte celular producida en la zona de progreso al realizar esta operación y por tanto a la pérdida de progenitores ya especificados. Además, experimentos de trazado de linaje marcando con el colorante Dil células en distintas franjas de la zona de progreso, les llevaron a la conclusión de que cada una de estos grupos de células se adscribían sólo a una de los segmentos proximo-distales y no se mezclaban unas con otras. Sin embargo, experimentos de análisis clonal y de marcajes más sistemáticos del eje proximodistal han demostrado la inexistencia de restricciones entre segmentos proximodistales (Arques et al., 2007; Sato et al., 2007).

El grupo de Sato hace un trazado de linaje muy detallado marcando células a distintos niveles proximo-distales de la zona de progreso a 19HH y 23HH y llegan a la conclusión de que a estadíos tempranos hay una gran mezcla entre las células que van a dar autopodio y zeugopodio en la zona de progreso, mientras que a estadíos más tardíos el límite entre estos dos segmentos se va refinando cada vez más. En cambio el límite entre estilopodio y zeugopodio parece bastante definido desde 19HH. Por tanto, según estos investigadores la especificación no parece progresiva como indicaba el modelo de la zona de progreso aunque tampoco tan temprana como indicaba el modelo de especificación temprana, al menos para los elementos distales, cuyos precursores parecen sufrir una regionalización progresiva (Sato et al., 2007).

### **2. 3. 2. 2. Una combinación de señales del flanco y del AER dirige la formación del patrón proximo-distal: Modelo de las dos señales y Modelo de intercalación**

Trabajos realizados en el embrión de pollo, demostraron que *Meis1*, un factor de transcripción homeobox que confiere identidad proximal (Mercader et al., 1999) es inhibido en el extremo distal de la extremidad por FGFs provenientes del AER y es activado por Ácido Retinoico (RA) proveniente del flanco en la parte proximal; de ese modo los FGFs se

presentaban como factores instructivos y no sólo permisivos que promovían la distalización de la extremidad (Mercader et al., 2000). Basándose en este trabajo se formuló el “modelo de las dos señales” que sugiere que los distintos destinos proximo-distales surgen gracias al balance entre la señal de ácido retinoico (RA) y los FGFs. Según este modelo, a estadios tempranos cuando el AER está aún cerca del flanco todo el esbozo de la extremidad expresa tanto *Meis* como FGFs; según avanza el crecimiento, la señal de los FGFs se aleja de la de RA, de manera que la baja concentración de este último permite la represión de *Meis* por parte de los FGFs. En ese momento, se crea un dominio *Meis* + y un dominio *Meis* - donde se empiezan a expresar los miembros 5' de los complejos génicos *HoxD* y *HoxA*; el primero que se expresa tras la represión de *Meis* en el dominio distal es *Hoxa11*, y posteriormente lo harán *Hoxa13*, marcador de autopodio y *Hoxd13*, marcador de la parte más proximal del autopodio.

Recientemente, se ha logrado interrumpir la función de varios de los miembros de la familia de los FGFs al mismo tiempo en la extremidad del ratón con el fin de revelar la contribución de cada uno de ellos en el patrón esquelético de esta estructura. Como se ha comentado en párrafos anteriores, la triple interrupción de los genes *Fgf4*, *Fgf9* y *Fgf17* da lugar a una extremidad totalmente normal, ya que la función de estos es totalmente compensada por *Fgf8*. Para desvelar la función de cada uno sin la intervención de este último, se hicieron mutantes combinados. Los mutantes de *Fgf8* y *Fgf4* y los mutantes de *Fgf8* y *Fgf9* tenían distintas hipoplasias en zeugopodio y autopodio, siendo más agudo el fenotipo en el primer caso; ambos patrones esqueléticos eran diferentes de los obtenidos en el mutante de *Fgf8*. El doble mutante de *Fgf8* y *Fgf17* era mucho más leve y sólo carecía de uno de los dígitos. Sorprendentemente, la severidad aumentaba bastante si se mutaba, *Fgf8*, *Fgf4* y un alelo de *Fgf9*, obteniendo una extremidad carente de zeugopodio pero con la formación de algunas falanges. En el triple *Knock-out* completo de estos tres genes sólo se formaba la escápula. Además, la severidad del fenotipo correlacionaba con crecientes niveles de muerte celular en la parte dorsal-proximal del esbozo de la extremidad a E10,5. Estos resultados indican que cuando *Fgf8* sólo es transitoriamente activado (ver punto 2. 3. 2. 1.), los demás FGFs compensan parcialmente su función (Mariani et al., 2008)

Uno de los descubrimientos más relevantes de este trabajo es que el dominio de expresión de *Meis*, estaba extendido hacia el dominio distal en los mutantes. Esta expansión ectópica de *Meis* les sirve a los autores para entender los fenotipos de hipoplasia de zeugopodio y autopodio, argumentando que se produce una proximalización de las células que van a formar las condensaciones distales a favor de los elementos proximales, y, por tanto, hay un exceso de células en proximal que se eliminan por muerte celular y una depleción de células en el dominio distal (Mariani et al., 2008). Estas observaciones constituyen la primera evidencia genética de que los FGFs inhiben un gen de especificación proximal y da soporte a la idea de subdivisión primaria entre un dominio proximal y otro distal por señales, pero no explica la generación de los subsecuentes dominios distales. De igual manera, el modelo de las dos señales no explicaba el fenotipo de falta de zeugopodio de los mutantes triples *Fgf8* -/-; *Fgf4* -/- y *Fgf9* +/- y por esta razón Mariani y colaboradores postularon el “Modelo de Intercalación”, que ya había sido previamente formulado en trabajos sobre la regeneración de las extremidades en anfibios. En este modelo primero se formarían un dominio *Meis* + proximal y otro *Meis* - distal, que posteriormente por interacción célula-célula generarían un dominio intermedio entre ellos (zeugopodio prospectivo) (Mariani et al., 2008).

En conclusión, tanto experimentos genéticos como experimentos de regulación en el embrión de pollo apoyaban la idea de que la especificación PD viene dada por señales difusibles y no autónomas, como sugería el modelo de la zona de progreso.

### **2. 3. 2. 3. Expresión y regulación de los genes implicados en el patrón proximo-distal: Modelo del frente de diferenciación**

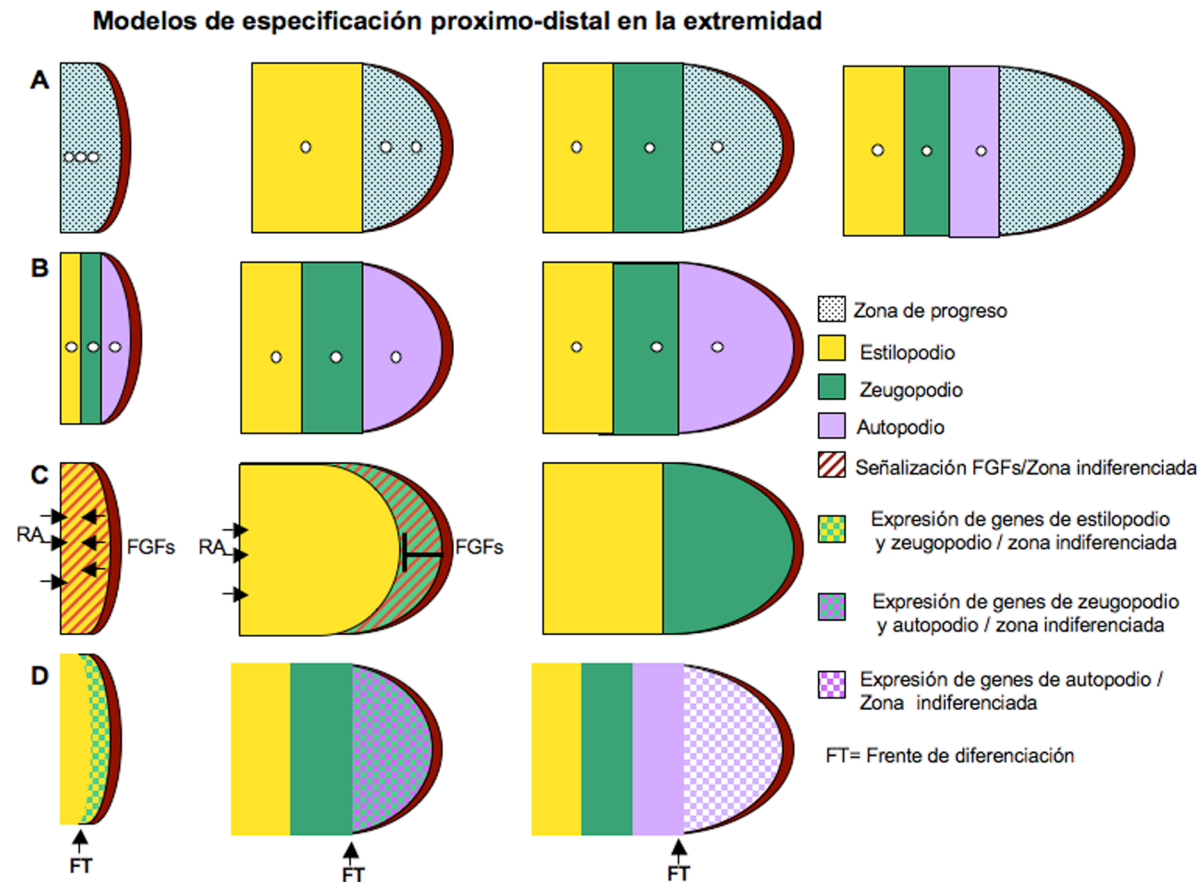
Existen tres genes cuya expresión delimita la identidad de los tres elementos esqueléticos del eje PD: *Meis1*, que marca estilopodio, *Hoxa11* que marca zeugopodio y *Hoxa13* que marca autopodio. Como se ha mencionado anteriormente, el gen *Meis1* tiene cierta capacidad proximalizante (Mercader et al., 1999), a pesar de que su inactivación no afecta al desarrollo de la extremidad (Azcoitia et al., 2005). También existen estudios de que la inactivación del gen *Hoxa13*, expresado en el autopodio, favorece la adhesión celular en esta región y que su sobreexpresión en otras zonas de la extremidad como el zeugopodio impide una correcta formación de los elementos cartilaginosos, atribuible (Yokohuchi et al., 1995; Stadler et al., 2001). En cambio, cuando todos los genes Hox del grupo parálogo 11 presentes en la extremidad son inactivados, el zeugopodio se forma normalmente, aunque debido a defectos en la condrogénesis, se encuentra reducido (Tabin and Wolpert, 2007). No obstante, independientemente de que estos sean los verdaderos genes de especificación de identidad PD ó no, su expresión restringida a cada uno de los segmentos proximo-distales, les convierte en un instrumento valioso para el estudio de la regulación génica dentro de este eje, ya que o bien podrían estar regulados por los verdaderos genes de especificación ó funcionar en vías paralelas (Tabin and Wolpert, 2007).

Otro de los marcadores importante es AP2, que se expresa en la zona de células indiferenciadas localizada debajo del AER durante el desarrollo de la extremidad. A 17HH, cuando se comienza a observar el esbozo de la extremidad en el embrión de pollo, *Meis1* se expresa por todo el mesénquima, solapando con la expresión de AP2. A 19HH se empieza a expresar *Hoxa11* en una fina línea posterior-distal, que inicialmente solapa con *Meis1* y AP2, y posteriormente, define un dominio distal donde *Meis1* no se expresa. Alrededor de 21HH, comienza a expresarse *Hoxa13* en un dominio posterior-distal que solapa con *Hoxa11*; a 23HH, el dominio de *Hoxa13* se ha expandido por toda la zona de células indiferenciadas y solapa muy poco con *Hoxa11*, mientras que *Meis* se retrae hacia proximal; Progresivamente, *Hoxa 11* deja de expresarse en el extremo más distal. Finalmente *Hoxa11* y *Hoxa13* forman dominios excluyentes (Tabin and Wolpert, 2007).

La dinámica de los patrones de expresión de estos genes no coincide con el modelo de la zona de progreso, ya que ninguno se expresa periódicamente como un reloj molecular, y tampoco con el modelo de especificación temprana, ya que algunos de estos genes se coexpresan en la zona indiferenciada en determinados estadios. Debido a esta incongruencia, Tabin y Wolpert deciden formular un nuevo modelo para explicar los experimentos clásicos y los patrones de expresión de los marcadores proximo-distales. Este modelo postula que, una vez las células están apunto de salir de la zona indiferenciada, y por tanto van a iniciar la diferenciación, sólo expresan uno de estos genes dependiendo del elemento esquelético que se vaya a formar en ese momento. Basándose en esta idea, la región más proximal de la zona indiferenciada adquiere el nombre de **“frente de diferenciación”**. De este modo, las truncaciones producidas al retirar el AER atenderían al nivel de especificación adoptado en esa región justo antes de la diferenciación.

En cuanto a la regulación de estos genes, como ya se mencionó anteriormente, *Meis1* se activa por RA y se reprime por los FGFs del AER; *Hoxa11* parece activarse por los FGFs. Se desconoce si *Hoxa11* y *Meis* se autorregulan mutuamente y tampoco si lo hacen *Hoxa13* y *Hoxa11*, aunque sí se sabe que *Meis1* es capaz de reprimir la expresión de *Hoxa13* y viceversa (Mercader et al., 2000).

**Fig. 4**



**Fig. 4 Modelos de formación del patrón proximo-distal en la extremidad**

**A:** Modelo de la zona de progreso: el tiempo que pasan las células en la zona de progreso (área punteada) define su posición en el eje proximo-distal. **B:** Modelo de especificación temprana: los precursores de cada elemento proximo-distal ya están especificados desde un estadio temprano. **C:** Modelo de las dos señales: señales instructivas del flanco y señales permisivas e instructivas del AER especifican la zona de estilopodio y zeugopodio. **D:** Modelo del frente de diferenciación: el gen que se esté expresando en el frente de diferenciación (línea divisoria entre la zona cuadrículada que representa la zona indiferenciada y los bloques de colores sólidos que representan los distintos elementos proximo-distales) es el que determina el destino que tomarán las células que salen de la zona indiferenciada.

## **2. 4. Especificación a lo largo del eje Antero-Posterior (AP) de la extremidad**

¿Por qué son diferentes el dedo uno y el dedo cuatro de una pata de un embrión de pollo? ¿y el radio y la ulna?. En este caso células con un valor posicional parecido en el eje proximodistal pasan a formar elementos esqueléticos muy diferentes; Esto es debido a que su valor posicional dentro del eje antero-posterior es diferente.

### **2. 4. 1. La zona de actividad polarizante (ZPA)**

Las primeras evidencias de cómo se formaba el patrón antero-posterior vinieron de la mano de experimentos clásicos, en los cuales cuando se transplantaba una región de mesénquima posterior del esbozo del ala del embrión de pollo en el mesénquima anterior, se generaban duplicaciones especulares de los dígitos (Saunders and Gasseling, 1968). Debido a la capacidad de esta región de transformar el mesénquima anterior en destinos más posteriores, este grupo de células se denominó **Zona de Actividad Polarizante (Zone of Polarizing Activity or “ZPA”)**.

Una década después de la formulación de éste modelo, se descubrió que la actividad polarizante de la ZPA residía en la molécula difusible **Sonic hedgehog (SHH)**, el homólogo en vertebrados del gen *hedgehog* de *Drosophila* (Riddle et al., 1993). Prueba de ello era que fibroblastos transfectados con esta proteína eran capaces de generar las mismas duplicaciones especulares de los dígitos que la ZPA (Riddle et al., 1993); además, bolas impregnadas con SHH tenían también la misma actividad polarizante (Lopez-Martinez et al., 1995). Más recientemente se ha demostrado que la ausencia de SHH en ratones mutantes para este gen provoca la pérdida de estructuras posteriores como el hueso de la ulna y todos los dígitos menos el dígito 1, que parece ser el único que no depende de SHH (Chiang et al., 2001; Kraus et al., 2001; Ros et al., 2003).

La transducción de la señal de SHH depende de factores de transcripción de la familia Gli, entre los cuales Gli3 es esencial en la especificación del eje anteroposterior de la extremidad. Este se presenta en su forma represora en la parte anterior de este eje y como forma activadora en la parte posterior, donde la actividad de SHH evita la conversión a su forma represora. La disrupción del gen de Gli3 da como resultado un exceso de dígitos con identidades erróneas (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Por tanto el gradiente de Gli3R resulta imprescindible para fijar el número y la identidad de los dígitos (Revisión Zeller et al., 2009).

#### **2. 4. 1. 1. Inducción y establecimiento del dominio de SHH**

Antes de que se exprese *Shh* en el esbozo de la extremidad, otras moléculas se encargan de marcar la polaridad antero-posterior y de iniciar la expresión de *Shh* en el mesénquima posterior. Una de ellas es *Hand2*, un factor de transcripción que se expresa en el mesénquima posterior cuando la extremidad empieza a emerger del flanco. *Hand2* evita la formación de la forma represora de Gli3, que queda restringido al mesénquima anterior, mientras que Gli3R suprime la expresión de *Hand2* en el mesénquima anterior (Ros et al., 1996; te Welscher et al., 2002). Gli3R también está implicado en la restricción de la expresión de los genes del grupo *HoxD* al mesénquima posterior en esta fase. Ratones deficientes en *Hand2* (Cohn, 2000) y en los genes *HoxD* (Tarchini et al., 2006) carecen de expresión de *Shh*, y por tanto son firmes candidatos como activadores de este gen; la confirmación de esta hipótesis es la demostración de la unión de estos factores de transcripción a secuencias reguladoras que controlan la expresión de *Shh* (Capellini et al., 2006; Zeller et al., 2009). Además de éstos, otros genes controlan la activación de SHH como la señal de FGF8 proveniente del AER

(Lewandoski et al., 2000) y la señal de RA proveniente del flanco (Niederreither et al., 2002) (Revisión Zeller et al., 2009).

## **2. 4. 1. 2. Difusión y señalización de SHH a lo largo del eje AP**

Una vez sintetizada, la proteína SHH se autoproteoliza y se secreta al medio extracelular. La proteína madura posee dos residuos lipídicos, una molécula de colesterol, que restringe su difusión y una de ácido palmítico que la favorece (Mann and Beachy, 2004).

El rango de actividad de SHH se estima en la mitad del esbozo de la extremidad; no obstante su difícil detección por inmunotinción hace que esto sea aún un tema de estudio.

## **2. 4. 2. Modelos de especificación del eje Antero-Posterior**

### **Pollo**

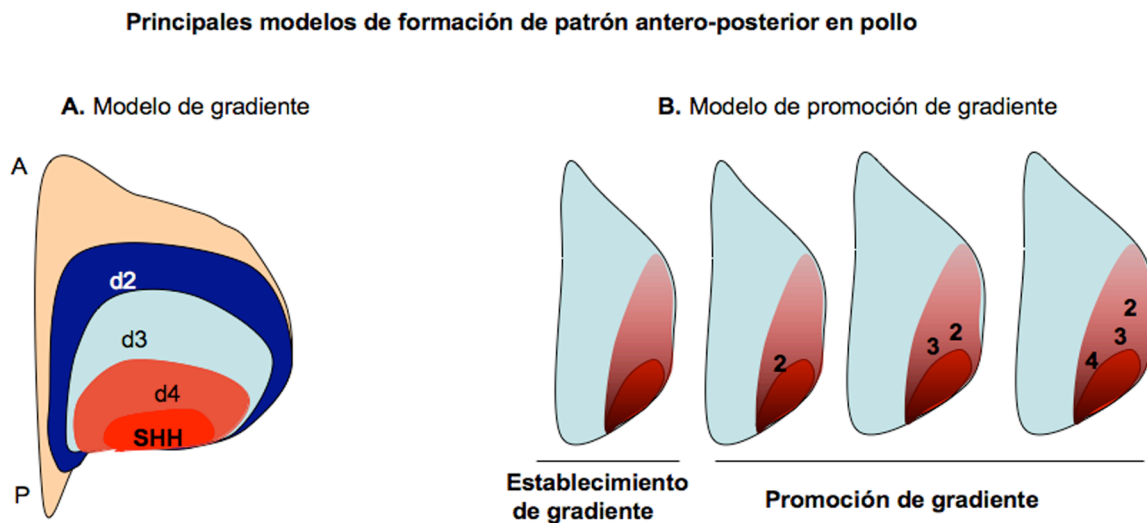
Los experimentos de trasplante de la ZPA al mesénquima anterior, llevaron a la formulación del **“modelo de gradiente de morfógeno”** postulado por Wolpert, en el que una molécula difusible (morfógeno) secretada por la ZPA difundía a lo largo del eje Antero-Posterior formando un gradiente de concentración decreciente. En este modelo las distintas concentraciones se traducirían en distintos destinos celulares, de manera que las concentraciones altas equivaldrían a valores posicionales más posteriores, mientras que las concentraciones bajas corresponderían a valores posicionales más anteriores (Wolpert, 1969).

**“El modelo de promoción de morfógeno en gradiente”** surgió como una modificación del modelo de gradiente de morfógeno en el que, además, se introduce el factor tiempo como factor esencial para la especificación AP. Este modelo se basa en experimentos de trazado de linaje en el ala del pollo en los que se observa que los progenitores de los dígitos se especifican para destinos anteriores, y según va aumentando la exposición a SHH, se van promocionando a destinos más posteriores (Yang et al., 1997; Bastida and Ros, 2008).

Un estudio más reciente considera el **crecimiento** del campo digital como elemento clave durante la especificación AP. En este trabajo se demuestra que SHH es capaz de controlar genes reguladores de ciclo celular implicados en la transición a fase S. Al tratar alas de pollo de estadio 20-22HH con tricostatina (TSA), un inhibidor de la proliferación celular, la expresión de SHH se anula, y, además, la extremidad se hace más pequeña, acortándose el campo digital. Por lo tanto, al bloquear la proliferación, se anula también el periodo de especificación de SHH que postula el modelo de promoción de morfógeno,

Una vez pasado el efecto de la droga se reinicia la proliferación y con ella la fase de especificación de SHH, que transforma el mesénquima del estrecho campo digital en dígitos posteriores, ya que no hay suficientes células para formar las condensaciones anteriores. En cambio, el tratamiento con un inhibidor de la transducción de SHH como es la ciclopamina que inhibiría tanto la proliferación como la especificación, da como resultado la pérdida de los dígitos posteriores, ya que el tiempo de exposición a SHH no es suficiente para especificar los dígitos posteriores (se reduce el tiempo de “promoción”). La conclusión de este trabajo es que la formación de patrón de los dígitos y su crecimientos son dos procesos acoplados (Towers et al., 2008).

**Fig. 5**



**Fig. 5 Principales modelos de formación de patrón en el eje antero-posterior en pollo**

**A:** Modelo de gradiente de morfógeno: Los umbrales de concentración de Shh (definidos con los tres colores de la bandera francesa) a lo largo del eje antero-posterior se traducen en tres valores posicionales correspondientes a los tres dígitos del ala del pollo. **B:** Modelo de promoción de gradiente de morfógeno: existe una fase inicial de establecimiento de gradiente y otra de promoción debido al crecimiento de la extremidad. Anterior siempre está arriba y posterior abajo.

## Ratón

Diferentes estrategias de *gene targeting* en publicaciones recientes han revelado que la generación de patrón en el eje antero-posterior de la extremidad de ratón es más compleja, y presenta ciertas diferencias con los modelos propuestos para el embrión de pollo.

### Modelo de gradiente espacio- temporal

Una de las aportaciones más interesantes a este campo, es el trabajo de Harfe y colaboradores (Harfe et al., 2004), en el que generan una línea *LacZ*, controlada por la expresión de la recombinasa *Cre* bajo el promotor de *Shh* (*ShhGFP<sup>Cre</sup>/+*, *R26R/+*), de manera que todas las células que en algún momento del desarrollo expresan *Shh* serán positivas para la tinción *LacZ*; esta estrategia lleva al descubrimiento de que las células que han expresado *Shh* contribuyen a parte del dígito 3 y a los dos dígitos más posteriores. La misma línea con una recombinasa inducible por tamoxifeno les permite activar el promotor de *Shh* en distintas ventanas temporales, lo que les lleva a la observación de que las células que expresan *Shh* durante más tiempo ocupan un lugar más posterior. Además, basándose en mutantes de *Dispatched1* (*Disp1*) (proteína que favorece la difusión de SHH y está implicada en la señalización paracrina pero no en la autocrina de esta molécula), los cuales pierden sólo el dígito 2, concluyen que la formación de los otros dedos no depende de la difusión de SHH. Según estos experimentos el único dígito que se formaría por gradiente de morfógeno sería el dígito 2, mientras que la especificación de los demás dígitos vendría dada por el tiempo que las células hayan expresado *Shh* y requeriría una señalización autocrina (Harfe et al., 2004).

Por lo tanto, de todos estos experimentos parece deducirse que durante la especificación de los dígitos en el embrión de ratón, no sólo es importante la concentración sino que el tiempo de exposición al morfógeno es una característica básica



que las células “memorizan” para conocer su identidad. En esta línea se encuentra otro trabajo publicado recientemente en el que ratones que tienen muy bajas concentraciones de SHH son capaces de formar dígitos posteriores, de lo que se deduce que tiene más peso sobre la especificación de los dígitos posteriores la concentración acumulada en un largo periodo de tiempo que una alta concentración por un tiempo más limitado (Scherz et al., 2007).

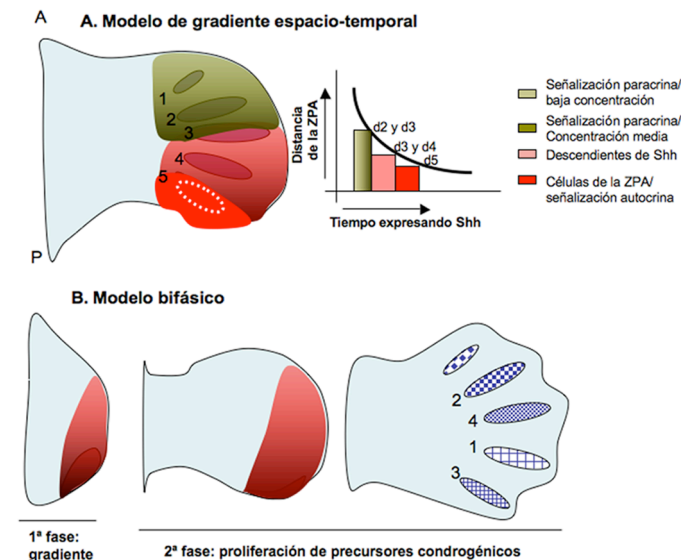
### **Modelo bifásico**

Los anteriores modelos se basan en interrupciones de la duración y señalización de SHH utilizando drogas farmacológicas como la ciclopamina, que también bloquea la función de otro miembro de la familia hedgehog, *Ihh*, implicado en la condrogénesis de los dígitos; estos resultados pueden ser, por esta razón, discutibles.

Para evitar este problema, otro grupo de investigadores delecionan el gen *Shh* en distintos estadios del desarrollo, cruzando una línea que lleva la recombinasa inducible por tamoxifeno bajo el promotor del gen *HoxB6* con una línea *knock-out* condicional de *Shh*.

La sucesiva anulación de la expresión de *Shh* por este método, resulta en la progresiva pérdida de dígitos en el orden: d3, d5, d2 y d4, un orden totalmente distinto al observado en estrategias experimentales anteriores. Este orden refleja justo la secuencia inversa a la que siguen las condensaciones cartilaginosas. No obstante, estos fenotipos no muestran un cambio de identidad en los dígitos, por lo que los autores postulan que SHH actúa en dos fases: una temprana que afectaría a la especificación, y otra más tardía (que sería la que se vería afectada con esta estrategia) que influiría en el número de progenitores necesarios para que se produzcan las condensaciones. Sin embargo, en discordancia con esto, los niveles de muerte y proliferación celular en el mesénquima no siguen una correlación espacial con la pérdida de dígitos (Zhu et al., 2008).

**Fig. 6**



**Fig. 6 Modelos de formación de patrón en el eje antero-posterior en ratón**

**A:** Modelo de gradiente espacio-temporal: las células que han expresado *Shh* durante más tiempo (rojo intenso) adquieren un destino más posterior. **B:** Modelo bifásico: SHH actúa en dos fases: en la primera establece el gradiente donde se especifican los destinos celulares y en la segunda favorece la proliferación de las células pre-condrogénicas. En la figura de la derecha se especifica el orden de condensación de los cuatro dígitos que dependen de SHH.

## **2. 5. Especificación del eje dorso-ventral en la extremidad**

En las extremidades de vertebrados existe una asimetría molecular en el eje dorso-ventral que se traduce en diferencias en la morfogénesis y especialización de los distintos tejidos como la piel, el músculo, los nervios, los tendones y los

huesos en este eje. Un ejemplo claro de la polaridad dorso-ventral son las estructuras derivadas de la piel en los mamíferos, los cuales tienen en la cara dorsal de sus extremidades una mayor densidad de pelos y poseen uñas en las puntas de los dedos, mientras en la palma de la “mano” ó del “pie” la piel se encuentra formando una especie de “almohadillas” y contiene muchas glándulas sudoríporas ecricinas.

El establecimiento de la polaridad dorso-ventral es un evento temprano dentro del desarrollo de la extremidad (12HH), que ocurre antes de que ésta comience a emerger del flanco. Esto se demostró en experimentos realizados en pollo donde se rotaba 180 grados el mesodermo presuntivo de la extremidad, lo cual provocaba que la polaridad dorso-ventral quedara invertida; esto implicaba que las señales mesodérmicas eran capaces de imprimir el carácter dorsal ó ventral en el ectodermo (Saunders and Reuss, 1974). No obstante, los mismos experimentos fueron realizados muchos años después por Michaud y colaboradores a 13HH sin obtener el mismo resultado. En este último caso, los autores se refieren a señales inductivas dorsalizantes procedentes de los somitos y señales inductivas ventralizantes procedentes de la somatopleura lateral, que proporcionarían la asimetría dorso-ventral al mesodermo presuntivo de la extremidad, cómo una posible razón de la inversión dorso-ventral en estadios tempranos (Michaud et al., 1997).

Estudios de trazado de linaje han demostrado que el ectodermo dorsal de la extremidad proviene del ectodermo que recubre el mesodermo paraxial y el mesodermo intermedio, y a medida que el primordio va creciendo, éste se traslada a una zona más lateral, mientras que el ectodermo ventral ocupa una zona más lateral a la del mesodermo presuntivo de la extremidad (Altshuler et al., 1997; Michaud et al., 1997). En qué orden se adquiere la polaridad dorso-ventral, si primero se establece en el mesodermo y luego en el ectodermo o por el contrario ocurre a la inversa, es un tema controvertido.

Sí se conoce, por experimentos en los que se invierte la posición del ectodermo en el eje dorso-ventral, que la polaridad dorso-ventral queda establecida en el ectodermo justo antes de la inducción de la extremidad (15HH)(Geduspan and MacCabe, 1986).

Una vez se induce la extremidad, existen varias moléculas clave que influyen en la determinación de la identidad dorsal ó ventral. *Wnt7a* es una glicoproteína secretada que se expresa en el ectodermo dorsal del esbozo de la extremidad; en el ectodermo ventral, por el contrario, se expresa *En-1*, un factor de transcripción que inhibe la expresión de *Wnt7a* en esta parte del ectodermo. *Wnt7a* activa *Lmx1b*, un factor de transcripción tipo LIM-homeodominio, en el mesénquima dorsal y ambas moléculas confieren identidad dorsal al mismo. Los ratones deficientes para cualquiera de estos genes tienen extremidades biventrales, aunque el fenotipo del mutante de *Lmx1b* se extiende por todo el eje proximo-distal, mientras que la ausencia de *Wnt7a* sólo afecta a estructuras antero-distales. En relación con el patrón dorso-ventral a lo largo del eje proximodistal, se han publicado varios trabajos recientemente que describen mediante trazado de linaje la existencia de un compartimento dorsal en el mesénquima que coincide con la expresión de *Lmx1b* (Arqués et al., 2007). Además, se ha comprobado que la expresión de *Lmx1b* sólo depende de *Wnt7a* únicamente en ese dominio antero-distal, mientras que su expresión en proximal parece estar controlada por otros factores (Chen and Johnson, 1999). Así mismo, los ratones que carecen del factor de transcripción *En-1* tienen extremidades bidorsales, fenotipo que al igual que en el caso de *Wnt7a*, sólo se manifiesta en la parte distal (Loomis et al., 1996; Loomis et al., 1998); como ya se ha comentado anteriormente, la ausencia de *En-1* afecta también a la morfogénesis y posicionamiento del AER.

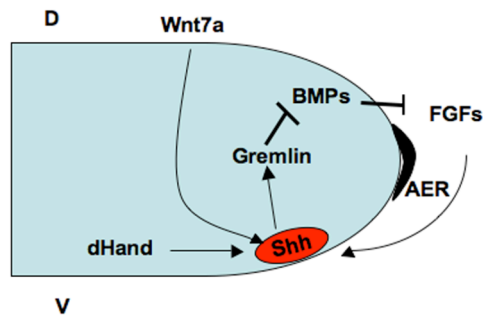
## **2. 6. Coordinación del crecimiento entre los tres ejes espaciales de la extremidad**

Para lograr un correcto crecimiento en las tres dimensiones del espacio, las redes de señalización que operan dentro de cada eje espacial están interconectadas con las de los otros ejes dando como resultado una compleja y fina regulación espacio-temporal de todos los eventos moleculares que intervienen en la morfogénesis de la extremidad.

Un ejemplo de ello es la estrecha relación entre el eje PD y AP, que se retroalimentan mutuamente. SHH es capaz de activar *Fgf4* en la mitad posterior del AER y a su vez *Fgf4* y *Fgf8* mantienen la expresión de *Shh* (Niswander et al., 1994); esta molécula activa a *Gremlin*, un inhibidor de BMPs que se expresa en el mesénquima de la extremidad, y que bloquea la acción supresora de estas proteínas sobre los FGFs del AER. De esta manera, se genera un bucle de retroalimentación positiva entre la ZPA y el AER que permite el crecimiento en el eje proximo-distal (Zuniga et al., 1999). A medida que crece la extremidad, las células que han expresado *Shh* se hacen refractarias a la activación de *Gremlin* en el mesénquima, y, como consecuencia, aumenta el espacio entre ellas y el dominio de expresión de este factor de transcripción; el resultado es que se va apagando la señal de este último y aumenta la expresión de las BMPs que provocan la regresión del AER (Scherz et al., 2004). Estudios genéticos recientes revelan que un aumento de la expresión de FGFs inhibe la expresión de *Gremlin* en el mesénquima y por tanto la terminación del bucle de regulación entre el AER y el mesénquima posterior de la extremidad (Verheyden and Sun, 2008).

También el eje dorso-ventral está interconectado con los demás ejes como muestran evidencias genéticas en las que la ausencia de *Wnt7a* en la extremidad del ratón provoca una pérdida de dígitos posteriores (Parr and McMahon, 1995). Experimentos de ablación del ectodermo dorsal en pollo avalan también esta tesis, ya que tras esta operación la expresión de *Shh* se ve notablemente afectada, lo cual tiene como consecuencia una pérdida de elementos esqueléticos posteriores (Yang and Niswander, 1995).

**Fig. 7**



**Fig. 7** Interacción entre las rutas de señalización de los tres ejes de la extremidad  
Las flechas indican activación y las líneas en forma de T inhibición

## **2. 7. Origen y formación de los distintos tejidos de la extremidad de vertebrados.**

La extremidad de vertebrados está formada por distintos tejidos interconectados cuyo desarrollo y coordinación resulta esencial para la capacidad motora de esta estructura.

Algunos de estos tejidos como el cartílago, los tendones y el tejido conectivo provienen del mesénquima residente de la extremidad, es decir de la placa lateral mesodérmica; por el contrario, otros como el músculo y las células endoteliales provienen del mesodermo paraxial.

### **2. 7. 1. Elementos óseos y cartilaginosos en la extremidad**

El esqueleto de la extremidad de vertebrados está formado por los huesos del hombro que conectan el tronco con el esqueleto apendicular y los huesos que dan soporte a la extremidad propiamente dicha. En el caso de la extremidad anterior, los huesos del hombro son la clavícula, hueso que conecta el esternón con la parte más lateral de la escápula, y

la escápula, con una parte ancha medial (cuerpo de la escápula) situada en la parte posterior y superior del torax, y una parte lateral más estrecha que se conecta con la clavícula y el húmero. La articulación de la escápula con la clavícula se forma mediante la unión de la parte más lateral de esta última con el acromión de la escápula, una protuberancia ósea que emerge en la zona lateral de la misma. El hueso más proximal fuera del tronco es el húmero, y se conecta con la escápula mediante una articulación constituida por la epífisis proximal del húmero y la fosa glenoidea localizada en el cuello escapular. Los siguientes huesos más distales son el radio y la ulna (ó cúbito para ratón y humano), y por último, los huesos de la “mano”, carpales, metacarpales y huesos de las falanges.

Todos los huesos que emergen del tronco se originan de la placa lateral mesodérmica, a excepción de la escápula que también tiene contribución de células de los somitos (Huang et al., 2000). En el embrión de pollo se ha demostrado que la clavícula proviene de células de la placa lateral mesodérmica (Chevallier et al., 1976), aunque su origen en ratón sigue siendo un tema bastante controvertido.

Todos los huesos de la extremidad, a excepción de la clavícula, se forman por osificación endocondral, en la que primero se forma un molde de condrocitos (cartilago) que luego es reemplazado por células óseas. En la clavícula, por el contrario, existe una parte que se forma por osificación membranosa, donde las células mesenquimales de la condensación se diferencian directamente a células óseas, sin pasar por una fase cartilaginosa (ver capítulo de “La clavícula” más adelante).

**Fig. 8**

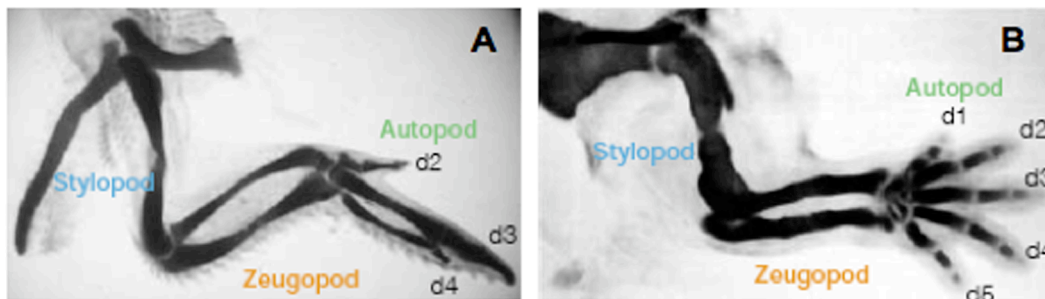


Imagen reproducida del Gilbert SF, 7ª edición

**Fig. 8\_ Elementos esqueléticos (todos menos la clavícula) en una extremidad anterior de pollo (A) y una extremidad anterior de ratón (B)**

### **2. 7. 1. 1. Osificación membranosa**

La osificación membranosa consiste en la diferenciación directa de las células mesénquimales en osteoblastos, los precursores de las células óseas, sin la intermediación de una fase cartilaginosa. Esta consta de varias fases:

Primeramente se produce una profusión de vasos en la zona que va seguida por una proliferación de células mesenquimales; posteriormente estas células comienzan a diferenciarse en osteoblastos que sintetizan materia osteoide compuesta fundamentalmente por colágeno I. Estos osteoblastos degeneran ó quedan incluidos en la materia osteoide como osteocitos. La matriz se va calcificando gracias a las sales transportadas por los vasos sanguíneos y formando pequeñas espículas de hueso que luego se fusionan formando trabéculas. En la última fase, se lleva a cabo la remodelación del hueso y se forma el periostio, membrana compuesta de células mesenquimales y una matriz extracelular fibrosa. Esta capa contiene vasos sanguíneos que nutren el hueso (*Skeletal system.net*).

## 2. 7. 1. 2. Osificación endocondral en la extremidad

En la osificación endocondral, primero se forma un molde de cartílago que posteriormente es reemplazado por hueso.

La primera etapa de la osificación endocondral es la agregación de un conjunto de células mesénquimales para formar una condensación; de esta condensación pueden derivar uno ó varios elementos esqueléticos. Para que se forme esta condensación las células comienzan a proliferar y adquieren una adhesión diferencial respecto a las células que las rodean. (Revisado en Hall and Miyake, 2000).

Una vez la condensación alcanza su tamaño adecuado, las células mesenquimales diferencian a condrocitos, mientras que las células de la periferia forman una capa externa llamada pericondrio. Los condrocitos son células especializadas que secretan matriz extracelular compuesta fundamentalmente por colágeno II y el proteoglicano agregan. Según avanza el crecimiento, algunos de estos condrocitos localizados en el centro de la condensación dejan de proliferar y se agrandan convirtiéndose en condrocitos hipertróficos que dejan de sintetizar colágeno II y comienzan a sintetizar colágeno X.

Los condrocitos hipertróficos son células muy importantes ya que dirigen y regulan la osificación. Una de sus funciones es sintetizar VEGF, factor de crecimiento vascular capaz de promover la penetración de vasos portadores tanto de condroclastos, células que sintetizan proteasas como la metaloproteinasa 9 encargadas de digerir la ECM permitiendo la entrada de más vasos, como de osteoblastos, células que poblarán el centro de la condensación convirtiéndose en osteocitos que secretan matriz extracelular ósea rica en colágeno I. Los condrocitos hipertróficos también secretan señales implicadas en la diferenciación de las células del pericondrio a osteoblastos, los cuales forman un anillo óseo en la periferia de la condensación. Mientras en el centro de la condensación los condrocitos hipertróficos son reemplazados por células óseas, en los extremos el hueso sigue creciendo gracias a la proliferación de condrocitos no hipertróficos que adquieren una disposición en columnas.

A medida que el hueso va creciendo, en los extremos se forman centros de osificación secundaria; entre los centros de osificación secundaria y primaria se forma una “placa de crecimiento” donde los condrocitos siguen proliferando y manteniendo el crecimiento del hueso hasta la pubertad. En el extremo de la placa de crecimiento se establece un grupo de condrocitos con una disposición columnar y una tasa de proliferación menor denominados *resting chondrocytes*, que sirven como reservorio.

A la vez que se va depositando matriz ósea gracias a la acción de los osteocitos, otras células denominadas osteoclastos reabsorben esta matriz mineralizada y, como consecuencia, se forma una cavidad en el seno del hueso que constituye la médula ósea donde se realiza la hematopoyesis definitiva durante la edad adulta. Mientras los osteoblastos tienen un origen mesenquimal, los osteoclastos proceden de los mismos precursores que los monocitos y macrófagos.

(Revisado en Kronenberg, 2003)

### Factores de transcripción que dirigen la condrogénesis y osteogénesis.

**Sox9** (*Sry-related HMG-box 9*) es un factor de transcripción clave en la diferenciación de las células mesénquimales a condrocitos, y también en la subsiguiente diferenciación de estos durante la osificación endocondral. Sox9 se expresa desde muy temprano en las condensaciones pre-condrogénicas y en los condrocitos en proliferación, y durante la condrogénesis estimula la transcripción de moléculas de la matriz extracelular del cartílago como *Col2a1*(cadena de colágeno alfa1 (II) isoforma1), *Col11a2* y el proteoglicano agregan.

Experimentos de ratones *Sox9* -/- quiméricos revelan que las células que carecen de este factor de transcripción no son capaces de contribuir a las condensaciones cartilaginosas. En esta misma línea, los ratones que carecen

completamente de Sox9 en el mesénquima temprano de la extremidad, no forman condensaciones cartilaginosas y muestran un incremento en la apoptosis. La interrupción más tardía de este gen provoca una disminución de la proliferación de los condrocitos, una bajada de la expresión de moléculas de la ECM y una bajada de la activación de la vía IHH-PTHrP, necesaria para la regulación de la diferenciación de condrocitos a condrocitos hipertróficos. Otros factores de transcripción de la familia Sox, Sox5 y Sox6, cooperan con Sox9 durante la condrogénesis, a pesar de que no poseen dominio de trans-activación (Revisado en Kronenberg, 2003).

Aunque no se ha conseguido determinar su papel en la formación de patrón de los elementos esqueléticos de la extremidad, los genes Hox tienen una función clave durante la condrogénesis. Se ha demostrado que los ratones deficientes para los genes parálogos *Hoxa11* y *Hoxd11*, tienen defectos en la diferenciación y crecimiento de los condrocitos, aunque las condensaciones sí llegan a formarse (Boulet and Capecchi, 2004)

**Runx2/Cbfa1** es un factor de transcripción de la familia del gen de regla par (*paired ruled gene*) *runt* de *Drosophila*, cuya función es esencial en el proceso de condrogénesis y osteogénesis tanto endocondral como membranosa. Su expresión se observa ya en las condensaciones pre-cartilaginosas, es baja en los condrocitos en proliferación y se reactiva en los condrocitos pre-hipertróficos e hipertróficos. También se expresa intensamente en el pericondrio y en osteoblastos.

Los ratones que carecen de este gen no tienen osteoblastos y poseen un retraso en la maduración de los condrocitos a condrocitos hipertróficos; además los condrocitos hipertróficos que llegan a término presentan una bajada en la mineralización de la matriz extracelular y una disminución de genes que se activan durante la osificación como la osteopontina ó la metaloproteinas 13. (Revisado en Karsenty and Wagner, 2002; Kronenberg, 2003).

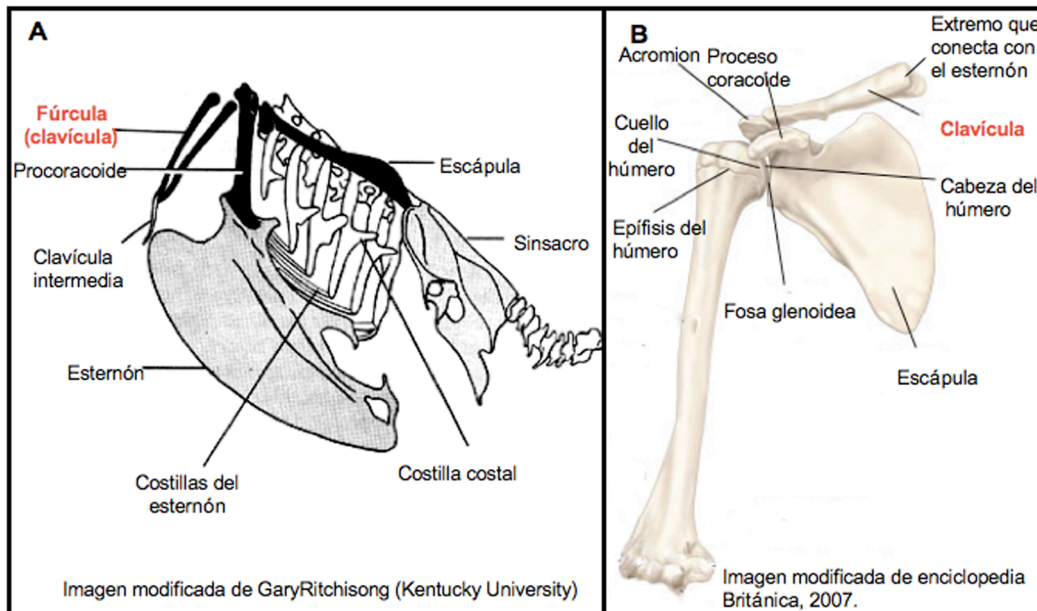
### **2. 7. 1. 3. La Clavícula: un hueso diferente**

La clavícula tiene varias particularidades: es el primer hueso que se osifica junto con la mandíbula, y es el único elemento procedente del exoesqueleto dermal localizado en el tronco.

El exoesqueleto tiene una función protectora en el reino animal, proviene de células de la cresta neural y se forma por osificación intramembranosa. En cambio el endoesqueleto (fundamentalmente huesos axiales y apendiculares) tiene una función de soporte y locomoción, su origen es mesodérmico y su primer tejido esquelético es el cartílago que posteriormente se transforma en hueso por osificación endocondral.

A pesar de estar considerado como hueso dermal desde un punto de vista evolutivo, la clavícula de algunas especies tiene características tanto de hueso dermal como de hueso del endoesqueleto; tanto unas como otras se describen a continuación (Hall, 2001).

**Fig. 9**



**Fig. 9 Cintura pectoral en aves (A) y en mamíferos (ratón y humano) (B).**  
A muestra una visión lateral y B una visión ventral.

### **2. 7. 1. 3. 1. Desarrollo de la clavícula en los mamíferos**

Varios trabajos han revisado la histogénesis de la clavícula en mamíferos, obteniendo resultados contradictorios. No obstante la mayoría de los estudios realizados en este campo resaltan dos tipos de osificación que concurren en la clavícula: membranosa y endocondral, con algunas diferencias entre roedores y humano.

#### Humano

Lo primero que se observa en el embrión humano es una condensación fibrocelular independiente de los huesos proximales de la extremidad y del esternón, a estadio 17, 18 ó 19, alrededor de las 6 semanas de gestación. Inmediatamente después de la condensación, a estadio 18, 19 ó 20 (6 semanas y media), se forman dos centros separados de osificación intramembranosa, uno lateral y otro medial, que posteriormente se fusionaran para dar un único centro de osificación. En los extremos de este centro de osificación, se van a formar sendos cartílagos secundarios (este tipo de cartílago, se forma en huesos de osificación intramembranosa, una vez diferenciado el hueso, a partir de las células del periostio). Al final del periodo embrionario e inicio del periodo fetal, el cartílago secundario de la parte medial empieza a crecer como una placa de crecimiento de un hueso largo e inicia una fase de osificación endocondral; a pesar de sus semejanzas con el crecimiento de huesos largos, este cartílago se asemeja más en la organización de los condrocitos al cartílago articular (Gardner, 1968).

#### Ratón y rata

En ratón, Huang y colaboradores (Huang et al., 1997) han estudiado el desarrollo de la clavícula mediante la realización de hibridaciones "in situ" sobre cortes histológicos con marcadores de cartílago y hueso. La conclusión más relevante de

este trabajo es que la clavícula se forma por osificación membranosa en su parte lateral (la más cercana al húmero) y por osificación endocondral en su parte medial (más cercana al esternón). Éstos investigadores distinguen las siguientes fases en el desarrollo de este hueso:

**E13:** Condensación del blastema de la clavícula; **E13,5:** Se observan células más grandes en el centro de la condensación; **E13,5-14:** Diferenciación del cartílago en la parte medial con expresión de *Col2a1*, *Sox9* y *agrecan*. En la parte lateral se inicia la osificación intramembranosa con expresión de marcadores como *Col1a1(cadena  $\alpha 1$  (I), isoforma 1)* y la *osteopontina*; **E14,5:** Desarrollo de una placa de crecimiento en la parte medial con diferenciación de condrocitos hipertróficos que expresan colágeno tipo X y que preceden a la osificación endocondral en esta zona.

A excepción del ratón, en otros mamíferos, se ha descrito también un crecimiento endocondral y otro membranoso del hueso de la clavícula, pero el primero a partir de un cartílago secundario. Tal es el caso del embrión humano descrito anteriormente y el de rata. En este último caso, Ronning y colaboradores (Ronning and Kantomaa, 1988) describen un crecimiento endocondral a partir del cartílago secundario de la parte medial de la clavícula semejante al crecimiento endocondral del cóndilo mandibular. Estos autores se refieren a este cartílago como un cartílago hialino con la siguiente estructura: un tejido fibroso periférico, una capa de células mesénquimales altamente empaquetadas y condrocitos en distintas fases de maduración (Ronning and Kantomaa, 1988).

### **2. 7. 1. 3. 2. Desarrollo de la Fúrcula (clavícula aviar) en las aves**

La fúrcula ó clavícula aviar, está constituida por la fusión del par de clavículas en la parte ventral del cuello. Al contrario que en otros tetrápodos, en las aves, la fúrcula se articula con la escápula en su parte lateral pero no lo hace con el esternón en su parte medial; En este caso, el esternón se articula con el coracoides, que lo conecta con la escápula.

En las aves, la fúrcula se forma por osificación membranosa, como queda patente en embriones mutantes *Talpid*<sup>3</sup> que tienen la osificación endocondral afectada, mientras la clavícula sigue intacta (Hinchliffe and Ede, 1968). Las distintas fases dentro del desarrollo de la fúrcula han sido descritas en el embrión de pollo por Brian K. Hall (Hall, 1986). Los primeros signos de condensación de la fúrcula se producen a estadio 31-32HH. A estadio 33HH se inicia la osificación a partir de un único centro de osificación; la osteogénesis progresa desde la parte lateral hasta la más medial. A estadio 35HH se forman dos cartílagos secundarios en ambos extremos del hueso a partir del periostio; éstos constituyen estructuras transitorias ya que a estadio 36HH ya no se observan.

### **2. 7. 1. 3. 3. Factores que influyen en el crecimiento de la clavícula**

Tanto en el embrión de pollo como en el de ratón se ha observado una dependencia del desarrollo de la clavícula de fuerzas biomecánicas, sobretodo en lo referente a la formación de los cartílagos secundarios. En el embrión de pollo, los cartílagos secundarios no se llegan a formar cuando el embrión ha sido paralizado con yoduro de decametONIO. Además, en estos embriones, las clavículas son más finas y no se llegan a fusionar en la parte medial (Hall, 1986). En este trabajo se concluye que el 40% del peso relativo de la clavícula y el 14% del incremento en longitud depende del movimiento del embrión.

En el ratón, también se ha visto una dependencia del cartílago secundario de fuerzas biomecánicas, ya que ratones *MyoD* *-/-* *Myf5* *-/-* que carecen de músculo esquelético, son capaces de iniciar la formación de cartílago secundario en la clavícula pero incapaces de mantenerlo. El cuerpo óseo de la clavícula parece deformado en estos embriones, más



compacto y con el extremo medial menos robusto (Rot-Nikcevic et al., 2007). En embriones de rata se ha comprobado la importancia del periostio en el crecimiento de la clavícula, ya que la retirada parcial de éste, da como resultado un alargamiento de la clavícula (Ronning and Kantomaa, 1988). Además de la influencia de los factores ya mencionados, es importante recalcar la importancia interacciones epitelio mesénquima son esenciales en el desarrollo de la clavícula; como ejemplo, se ha visto que, en el embrión de pollo la osteogénesis no progresa si se retira el ectodermo que recubre la condensación, al igual que ocurre con los huesos del esqueleto craneo-facial (Hall, 1986).

## **2. 7. 1. 3. 4. Origen de la clavícula**

### **Aves**

Experimentos de trazado de linaje tanto en pollo como en ratón han tratado de revelar el origen de las células que forman la clavícula; no obstante, a pesar de estos esfuerzos aún quedan múltiples incógnitas en lo referente a este tema. En el caso del embrión de pollo el sistema de marcaje celular más utilizado es el de los trasplantes de tejido entre pollo y codorniz, ya que las células de esta última se pueden detectar fácilmente mediante la utilización de anticuerpos convencionales que no detectan las células de pollo. Chevallier y colaboradores realizaron este tipo de ensayos en 1976 (Chevallier A. , 1976), intercambiando mesodermo presomítico de pollo por el tejido correspondiente del embrión de codorniz. Las conclusiones que sacaron fueron que mientras la escápula origen somítico, el coracoide, hueso que conecta con la escápula y el esternón, y la clavícula (Fúrcula) provenían de la somatopleura.

La fúrcula se ha considerado, desde el punto de vista evolutivo como un remanente del exoesqueleto de los tetrápodos ancestrales. No obstante, su carácter mesodérmico, contradice la idea históricamente aceptada del que las células del exoesqueleto proceden de cresta neural (Smith and Hall, 1990). Esta contradicción se ha explicado de distintas maneras, entre las cuales está aquella que postula que la clavícula de las aves pertenece al endoesqueleto y /o no es homóloga a la del resto de los tetrápodos, sino que es una neoforma evolutiva; la otra explicación es que la clavícula de las aves pertenece al exoesqueleto pero presenta contribución mesodérmica (Revisado en Hall, 2001). Ésta última opción está apoyada por experimentos de Schneider en embriones de pollo en los que células de cresta neural transplantadas a territorios mesodérmicos son capaces de formar parte de los huesos de la parte lateral del cráneo que son de origen mesodérmico en las aves y se originan a partir de cresta neural en mamíferos (Schneider, 1999).

Además, Hall concluye en su revisión, que el tipo de osificación, membranosa ó endocondral puede ser no coincidente con un origen de cresta neural en el primer caso y mesodérmico en el segundo (Hall, 2001).

A pesar de que existe un conflicto acerca de la homología de esta estructura con la clavícula de otros tetrápodos como los dinosaurios (ancestros de las aves que forman un grupo monofiléticos con ellas) y los mamíferos, muchas evidencias apoyan que sí existe esa homología. Una de estas evidencias es la coherencia entre las conexiones topográficas con los demás elementos de la cintura escapular entre aves y dinosaurios (Nesbitt et al., 2009).

Por tanto el consenso en este campo parece ser que el hueso de la fúrcula es de origen mesodérmico y mantiene una homología con la clavícula dermal del resto de los tetrápodos. No obstante, un trabajo realizado en el 2001 por McGonnell y colaboradores rebate esta idea, alegando que sí hay contribución de cresta neural en la clavícula de las aves. Para ello, hace ensayos de trazado de linaje en los que se sustituye los rombómeros 6/7 del pollo por el tejido correspondiente de un embrión de codorniz como método de marcaje celular. Según estos investigadores, existe una población de cresta neural post-ótica que expresa el gen *maf* y que se origina en estos rombómeros. Estas células siguen una ruta de migración específica hacia la parte caudal del tronco, por la parte ventral de los somitos hasta una zona más medial encima del corazón. Utilizando el anticuerpo QPCN específico de codorniz, analizan el destino de estas

células de cresta neural a E10 de incubación, detectándolas en el tejido conectivo y en el hueso de la parte medial de la clavícula (McGonnell et al., 2001). (Kontges and Lumsden, 1996; Matsuoka et al., 2005).

### Mamíferos: Ratón

El origen de este hueso en mamíferos ha sido un tema muy controvertido por la dualidad en la forma de osificación (membranosa y endocondral en el mismo hueso).

Recientemente, se ha publicado un trabajo que cuestiona el vigente “modelo de osificación”, el cual postula que las células de cresta neural dan lugar a huesos con osificación tanto membranosa como endocondral del cráneo, mientras que el mesodermo somítico sólo puede dar lugar a huesos endocondrales del tronco (Matsuoka et al., 2005).

A pesar de los grandes cambios evolutivos en el esqueleto del cuello y hombros, se sabe, por éste y otros trabajos, que existe una gran conservación en las conexiones músculo-esqueléticas. Estos autores demuestran que el sitio de inserción del músculo en el hueso es del mismo origen que el tejido conectivo que los comunica. De manera que se conservan los distintos linajes celulares que contribuyen a estas conexiones pero varía la diferenciación de estas células (Kontges and Lumsden, 1996; Matsuoka et al., 2005). Un ejemplo paradigmático que avala este nuevo modelo es la clavícula. Ensayos de trazado de linaje utilizando líneas reporteras bajo el control de promotores de cresta neural post-ótica pre-migratoria (*Wnt1-Cre*) y post-migratoria (*Sox10-cre*) y promotores de mesodermo somítico de la parte occipital (*Hoxd4-Cre*: somito 5 y posterior), se observa que la parte medial de la clavícula con osificación endocondral posee contribución de cresta neural al igual que el tejido conectivo del músculo esternocleidomastoideo que se inserta en esa región; en cambio, el centro de osificación posterior de la parte lateral de la clavícula (\*estos autores describen dos centros de osificación membranosa en la parte lateral, uno posterior y otro anterior) tiene contribución del mesodermo somítico, al igual que los músculos deltoides y pectorales que allí se insertan.

La conclusión de este trabajo es que las células de cresta neural, en contra de lo que se preveía, también son capaces de formar huesos post-craneales con osificación endocondral y que el mesodermo somítico puede contribuir a la formación de huesos post-craneales con osificación intramembranosa, invalidando de esta manera el viejo “modelo de osificación” (Matsuoka et al., 2005). Este trabajo estaría en concordancia con los ensayos de trazado de linaje realizados por McGonnell en el embrión de pollo.

Sin embargo, y a pesar de estos dos trabajos en pollo y en ratón, el origen de la clavícula sigue siendo tema de debate ya que esta contribución de cresta neural es muy pequeña (ver discusión).

## **2. 7. 1. 3. 5. Evolución de la clavícula desde los peces a los tetrápodos**

Los huesos de la cintura pectoral (*pectoral girdle*), incluida la clavícula, surgen por primera vez en la base del cráneo de los peces óseos primitivos. Éstos están íntimamente asociados con los huesos de la cabeza y consisten en un escapulocoracoide de origen endoesquelético que se articula con la aleta, rodeado de huesos dermales; en la parte ventral se localizan la clavícula y el cleitro (*cleithra*), que proporcionan estabilidad al escapulocoracoide, y en la parte dorsal el hueso post-temporal y el postcleitro. Esta combinación de huesos funciona en estos peces como protección de las branquias y del corazón.

La aparición de los tetrápodos y el uso de un par de apéndices para la locomoción, provoca grandes transformaciones en estos elementos esqueléticos. En los anfibios ya se observan los primeros cambios; en la zona prospectiva del cuello se pierden los elementos dermales dorsales y se añade un tercer tipo de vertebra además de las troncales y caudales:

las vertebrales cervicales. Todas estas modificaciones permiten una mayor movilidad del cráneo y una mayor estabilidad de éste durante el movimiento.

En la evolución de reptiles y aves se fueron perdiendo muchos más elementos dermales de éste “collarín” primigenio, hasta quedar la clavícula como único remanente dermal en la base del cuello en la mayoría de las especies. La cintura pectoral (*pectoral girdle*) se va ir desplazando posteriormente según se van añadiendo vertebrales cervicales para formar el cuello. Estos cambios permitirán la movilización de la cabeza independientemente de los apéndices, lo cual permite una mejor adaptación de los tetrápodos a la vida terrestre.

No obstante, a pesar de la pérdida y adaptación de éstos elementos esqueléticos en función de las necesidades de cada grupo de vertebrados, algunas interconexiones musculoesqueléticas se mantienen. Un ejemplo son los músculos que conectan el esqueleto de la lengua con el cuello en los gnatóstomos, y que son necesarios para elevar la laringe durante la deglución (McGonnell et al., 2001). Estas conexiones que permiten la coordinación de movimientos entre el cráneo y la parte más rostral del tronco están conservadas y parecen estar mediadas según diversos estudios por células de cresta neural craneal (McGonnell et al., 2001; Matsuoka et al., 2005).

### **2. 7. 1. 3. 6. Genes que afectan al desarrollo de la clavícula**

A pesar del gran avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo de la extremidad en la última década, las señales que regulan el crecimiento de la cintura pectoral, en concreto de la clavícula, siguen siendo una incógnita.

Los múltiples estudios realizados sobre la extremidad demuestran que, las partes más proximales de esta estructura (parte de la escápula y la clavícula entera), no se ven afectados por los centros de señalización que rigen el crecimiento del resto del esqueleto apendicular como son el AER y la ZPA (Sekine et al., 1999), y, por tanto, su desarrollo es independiente de ellos.

El estudio de varios mutantes de ratón con agénesis ó hipoplasia de la clavícula, comienza a sentar las bases en este campo del conocimiento. De los genes implicados en el desarrollo de este hueso, hablaremos a continuación.

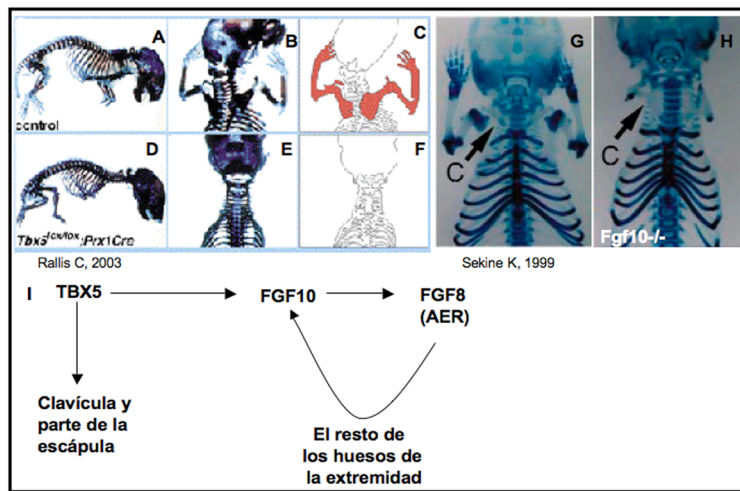
#### **Genes de formación de patrón**

##### ***Tbx5***

El factor de transcripción T-Box TBX5, es el factor más temprano conocido inducido en el campo de la extremidad anterior. Como ya se ha indicado anteriormente en la introducción, los genes Hox determinan la posición de las extremidades a lo largo del eje antero-posterior del embrión, fijando la posición del campo de la extremidad y favoreciendo la expresión de genes competentes para el inicio de esta estructura en esos niveles axiales. Uno de estos genes es *Tbx5* que se expresa en la zona prospectiva de la extremidad superior y provoca la expresión de *Fgf10* en el mesénquima; este factor es necesario para la proliferación de las células de la placa lateral mesodérmica y por tanto para el inicio del crecimiento del esbozo de la extremidad en el flanco. FGF10, a su vez, induce la expresión de *Fgf8* en las células ectodérmicas precursoras del AER, y FGF8 refuerza la expresión de *Fgf10*, iniciando el bucle de retroalimentación positiva que mantiene el crecimiento de la extremidad. Mutantes condicionales de falta de función de *Tbx5* en la extremidad del ratón no expresan *Fgf10* a E9,5 y el desarrollo de la extremidad se ve impedido, de manera que los neonatos carecen de todos los elementos esqueléticos de la extremidad incluidos la clavícula y la escápula. La ausencia de FGF10 conlleva la pérdida de la expresión de *Fgf8*, y, por tanto, la ruptura de la interacción mesénquima ectodermo esencial para el crecimiento proximo-distal (Agarwal et al., 2003; Rallis et al., 2003); no obstante, el fenotipo

esquelético de estos mutantes, al contrario que en los mutantes de *Tbx5*, sí mantiene intacta la clavícula y parte de la escápula, mientras que los demás huesos están ausentes (Sekine et al., 1999).

**Fig. 10**



**Fig. 10\_ Tinción esquelética de mutanes de *Tbx5* (D-F) y *Fgf10* (H).**

**A, B:** Azul-Alcian y Rojo Alizarin en un ratón salvaje (Wt). **C:** esquema donde se marca en rojo todos los elementos de la extremidad incluida la clavícula. **D, E:** Azul-Alcian y Rojo Alizarin en un ratón que tiene mutado el gen *Tbx5* en todo el mesénquima de la extremidad; una visión lateral (D) y una visión dorsal (E) de la caja torácica muestran la ausencia de todos los elementos de la extremidad incluidos la escápula y la clavícula. **F:** Esquema gráfico de la imagen en E. **G, H:** Comparación del esqueleto teñido con Azul Alcian de una ratón heterocigoto para el gen *Fgf10* (G) con un ratón homocigoto (H) que carece de todos los elementos esqueléticos de la extremidad menos parte de la escápula y toda la clavícula (flechas en G y H). C=Clavícula. I: Esquema de la cascada génica de inducción de la extremidad de ratón.

## **Pbx1**

Pbx1 es un factor de transcripción tipo homeodominio de la familia de proteínas TALE (*Three Aminoacid Loop Extensión*) homólogas a la proteína *Extradenticle* (EXD) de *Drosophila*, que forman complejos multiméricos de unión al DNA. La actividad transcripcional de este factor viene regulada por su transporte al núcleo mediado por proteínas tales como Meis y Prep1, pertenecientes también a la familia TALE de factores de transcripción, pero con algunas diferencias respecto a Pbx1. El heterodímero Meis/Pbx es capaz de unirse a proteínas Hox y aumentar su especificidad de unión al DNA.

En la extremidad de vertebrados *Meis* sólo se expresa en la parte proximal, restringiendo el rango de acción de Pbx1 a este nivel proximo-distal. Acorde con esto, los mutantes de *Pbx1* tienen distintos defectos en el esqueleto axial y apendicular. En este último, sólo los elementos proximales parecen estar dañados, como lo demuestra la hipoplasia de la parte proximal del húmero, escápula y clavícula, así como la fusión de escápula y húmero; además, la tuberosidad deltoide del húmero se encuentra separada de éste. El análisis histológico de las costillas de los mutantes demuestra una maduración prematura de condrocitos y una osificación acelerada (Selleri et al., 2001).

## **Pax1**

Pax1 es un factor de transcripción que pertenece a una familia de genes con un dominio tipo paired-box conservado. Este factor se expresa en el esclerotomo de los somitos y en el esqueleto axial en desarrollo, donde juega un papel fundamental en la formación de la columna vertebral. Pax1 también se expresa en el mesénquima anterior de la extremidad a estadios tempranos (E10,5) y más tarde, en parte de la condensación precondrogénica de la escápula y en su articulación con la clavícula.

Los ratones *undulated* que tienen este gen mutado presentan anomalías en las vértebras, en los discos intervertebrales y en la cintura escapular (en esta tesis también denominada cintura pectoral). Timmons y colaboradores han observado que tanto mutantes hypomórficos como mutantes nulos de este gen, provocan una severa reducción del acromion y fusiones entre este hueso y la clavícula (Timmons et al., 1994).

### **Alx3/Alx4**

*Alx3* y *Alx4* pertenecen a una familia de genes homeobox relacionados con el gen *aristal* de *Drosophila*, que desempeñan funciones importantes en el desarrollo del esqueleto craneofacial. Estos genes, junto con *Prx1*, *Prx2* y *Cart1*, se expresan durante la embriogénesis en el mesénquima craneofacial derivado de cresta neural y en el mesénquima del primordio de la extremidad. Desde un punto de vista funcional estos factores también presentan cierta redundancia ya que los ratones con mutaciones en varios de estos genes, muestran fenotipos más severos que los mutantes individuales. La ausencia de *Alx3*, por ejemplo, no produce ningún fenotipo, mientras que el doble mutante *Alx3/Alx4* tiene severas malformaciones craneofaciales, y algunos defectos en el esqueleto apendicular, entre ellos la reducción de la parte medial de la clavícula (la más cercana al esternón). En cambio, los mutantes individuales en el gen *Alx4* presentan gastrosquisis (herniación del sistema digestivo fuera del cuerpo) debido a defectos en el cierre de la pared ventral del cuerpo, anomalías en el hueso parietal del cráneo y polidactilia, pero no presentan este fenotipo en la clavícula. De esto se puede concluir que ambos genes tienen una función redundante en el desarrollo de este hueso (Beverdam et al., 2001). La polidactilia de los mutantes de *Alx4* está asociada a una expresión ectópica de *Shh* en el mesénquima anterior, acompañada de la expresión ectópica de otros genes controlados por esta molécula como *Hoxd13* en la ZPA ó *Fgf4* en el AER, por lo que parece que, al menos en parte, una de las funciones de *Alx4* y *Alx3* en el desarrollo de estructuras proximales es impedir la expresión de genes de patrón posterior en el mesénquima anterior (Qu et al., 1998).

### **Tbx15/Cart1/Alx3/Alx4**

Cómo ya se ha comentado en anteriores apartados, *Cart1*, *Alx4*, *Alx3* son genes homólogos al gen de *Drosophila* *Aristal*, con patrones de expresión parcialmente solapantes en el mesénquima craneofacial y en las extremidades, lo que se traduce en cierta redundancia funcional en el desarrollo de estas estructuras. Tanto *Alx3* como *Alx4*, se expresan en el mesénquima anterior de la extremidad a E10,5, mientras que *Cart1* se expresa de forma más ubicua y menos intensa en el mesénquima de la misma (Qu et al., 1998; Beverdam and Meijlink, 2001)

*Tbx15* es un factor de transcripción homeobox con un dominio T-box que caracteriza a esta familia de genes, los cuales realizan distintas funciones en el desarrollo de la extremidad. Los ratones deficientes en este gen presentan, entre otros defectos, un foramen en la parte más ancha de la escápula (*blade*), pero, al igual que los mutantes individuales de cada uno de los genes arriba referidos, no muestra ningún defecto en el desarrollo de la clavícula (Kuijper et al., 2005). Por el contrario, la combinación de varios de estos mutantes, muestran defectos tanto en la clavícula como en la escápula que parecen ser aditivos y dependientes de dosis, ya que afectan a distintas partes de estos dos elementos y muestran una mayor severidad en los triples mutantes.

Ya se ha comentado la reducción de la parte medial de la clavícula en los dobles mutantes *Alx3/Alx4*; no obstante los mutantes *Alx4/Cart1* revelan un fenotipo más severo que los anteriores, con una clavícula severamente truncada. La conclusión de estas observaciones es una mayor interacción funcional entre *Alx4* y *Cart1* en el desarrollo de la clavícula (Qu et al., 1999).

El fenotipo más severo se consigue con los cuádruples mutantes *Alx3/Alx4/Cart1/Tbx15*, en los que se ve una desaparición total de la clavícula, mientras que una sólo alelo *Wt* (*wild type*) de *Tbx15* en ausencia de todos los demás genes, mantiene un diminuto remanente de este hueso (Qu et al., 1999; Kuijper et al., 2005).

## **Ap2**

Ap2 es un factor de transcripción inducible por ácido retinoico que se expresa en linajes epiteliales y de cresta neural. Los ratones que carecen de este factor tienen anencefalia, defectos craneofaciales como la ausencia de boca y de huesos del oído medio como el anillo timpánico, reducción de algunos ganglios nerviosos como el ganglio trigémino. En el tronco, los mutantes presentan torácico-abdominoschisis debido a la ausencia de la pared ventral del cuerpo y defectos en el esqueleto axial, incluyendo escoliosis, caja torácica abierta como resultado de la no fusión de las costillas con el esternón, agénesis de las clavículas, y en ocasiones pérdida del radio en la extremidad anterior.

Los defectos craneofaciales revelan un posible fallo en linajes de cresta neural, a pesar de que la expresión del gen *LacZ* bajo el promotor de AP-2 en mutantes nulos de este gen no muestra la desaparición de estos linajes, lo cual indica que, probablemente, lo que está dañado es la diferenciación de estas células en su lugar de destino (Zhang et al., 1996).

## Genes que afectan a la osteogénesis de la clavícula

### ***Runx2/cbfa1***

Los factores de transcripción CBF (*core binding factors*) son una familia de proteínas heterodiméricas compuestas de una subunidad  $\beta$  igual para todos los miembros de la familia y una subunidad  $\alpha$  (CBFA1, CBFA2 y CBFA3) específica que da nombre a cada uno de ellos. Estos factores poseen una secuencia conservada de 128 aminoácidos denominada dominio Runt por su homología con el gen de regla par de *Drosophila runt*.

Cbfa2 y Cbfb se unen a secuencias consenso en el DNA de genes relacionados con la hematopoyesis, mientras que Cbfa1/RUNX2 es un regulador temprano de la osteogénesis embrionaria. Los ratones deficientes para este último no poseen osteoblastos y por tanto tienen completamente bloqueado el proceso de osificación. En los mutantes heterocigotos para este gen, el fenotipo más llamativo es una hipoplasia de la clavícula, en la que no se observan osteoblastos ni en la parte lateral ni en la parte medial, pero sí una matriz de cartílago desorganizado y no calcificado rodeado de una capa fibrosa. (Ducy et al., 1997; Otto et al., 1997)

### ***Twist2***

Las proteínas Twist son factores de transcripción del tipo hélice-bucle-hélice (*basic helix-loop-helix*). En vertebrados existen dos miembros, Twist1 y Twist2. Estos dos genes se expresan transitoriamente en pre-osteoblastos que expresan el factor de transcripción Runx2/cbfa1, implicado tanto en la osteogénesis endocondral como membranosa. La deficiencia de Twist1 ó Twist2 resulta en una prematura diferenciación de los osteoblastos, cuya explicación mecánica es la inhibición de Runx2 mediante la interacción de estas proteínas con su dominio de unión al DNA. Como se ha visto anteriormente, los ratones con una mutación en uno de los alelos de *Runx2* presentan una hipoplasia de los huesos parietales del cráneo y de la clavícula reminiscente del síndrome humano conocido como creidocranial displasia (CCD). La haploinsuficiencia de *Twist1* en mutantes heterocigotos para *Runx2* rescata el fenotipo parietal, mientras la haploinsuficiencia de *Twist2* en estos mismos ratones rescata el fenotipo hipoplásico de la clavícula. Por lo tanto, para que comience la osteogénesis sobre E13, las proteínas Twist tienen que liberar al factor Runx2, que comienza a expresarse bastante antes de que se inicie este proceso, alrededor de E10 (Bialek et al., 2004).

Tabla. 1

<b>Genes</b>	<b>Fenotipo esquelético</b>	<b>Fenotipo en la clavícula</b>
<b><i>Tbx5</i></b>	<i>Knock out</i> Condicional en la extremidad: caja torácica abierta y esternón ausente. Ausencia de todos los huesos de la extremidad anterior ( Rallis et al., 2003).	Agénesis de la clavícula ( Rallis et al., 2003)
<b><i>Pbx1</i></b>	Hipoplasia de los elementos proximales de la extremidad, incluyendo húmero, escápula y clavícula. Fusión de húmero y escápula ( Selleri et al., 2001).	Hipoplasia de la clavícula ( Selleri et al., 2001).
<b><i>Pax1</i></b>	Anomalías en las vértebras, discos intervertebrales y cintura escapular/pectoral ( Timmons et al., 1994).	severa reducción del acromion y fusiones entre este hueso y la clavícula (Timmons et al., 1994)
<b><i>Alx3/Alx4</i></b>	malformaciones craneofaciales (septo nasal abierto, y defectos en el esqueleto apendicular ( polidactilia , ausencia de la tuberosidad deltoides del húmero) (Beverdam et al., 2001).	Reducción de la parte medial de la clavícula (Beverdam et al., 2001).
<b><i>Alx4/Cart1</i></b>	Polidactilia , defectos craneofaciales ((exencefalia, septo nasal abierto), malformación en la mandíbula y esternón partido ( Qu et al., 1999); reducción de la escápula ( Kuijper et al., 2005)	Ausencia de la parte medial y parte lateral muy rudimentaria ( Kuijper et al., 2005)
<b><i>Tbx15+/- Cart1-/- Alx3-Alx4-/-</i></b>	Descrito cintura pectoral: Hipoplasia en acromion y parte anterior de la escápula (Kuijper et al., 2005).	Parte medial ausente y parte lateral muy rudimentaria (más reducida que en los mutantes <i>Alx4/Cart1</i> ) ( Kuijper et al., 2005).
<b><i>Tbx15 -/- Cart1-/- Alx3-/- Alx4 -/-</i></b>	Ausencia total de la parte anterior de la escápula y reducción severa del acromion (Kuijper et al., 2005).	Agénesis de la clavícula ( Kuijper et al., 2005).
<b><i>Ap2</i></b>	Anencefalia , defectos craneofaciales (oído medio y anillo timpánico), pérdida ocasional del radio, toraco-abdominosquisis (Zhang et al., 1996) .	Agénesis de la clavícula (Zhang et al., 1996).
<b><i>Runx2</i></b>	Heterocigotos: retraso generalizado de la osificación membranosa. Ausencia de la tuberosidad deltoides del húmero. Hipoplasia del hueso parietal e interparietal. Suturas y fontanelas ensanchadas. Muchos huesos de Wormian (huesos adicionales en las suturas) (Otto et al., 1997)	Heterocigotos: ausencia de osteoblastos y cartilago desorganizado en la clavícula. Homocigotos: no condensación mesenquimal de la clavícula (Otto et al., 1997)
<b><i>Twist2</i> (inhibidor de Runx2)</b>	Osificación prematura de costillas y clavícula (Bialek et al., 2004).	Osificación prematura de la clavícula que cursa con expresión prematura de osteocalcina en osteoblastos. La ausencia de <i>Twist2</i> rescata el fenotipo de la hipoplasia clavicular de los mutantes heterocigotos de <i>Runx2</i> (Bialek et al., 2004)..

## **Prdm16: Un nuevo gen implicado en el desarrollo de la clavícula**

En esta tesis identificamos un nuevo factor de transcripción implicado en el desarrollo de la clavícula: Prdm16. Se resume a continuación el conocimiento disponible en la literatura sobre este factor de transcripción.

El gen *Prdm16* (*PR-domain containing protein 16*) codifica para un factor de transcripción del tipo zinc finger, que contiene un dominio PR (*PRD1-BF1-RIZ1 homologous*) en su extremo N-terminal conservado entre los factores de la misma familia PRDM1/PRD1-BF1 (*positive regulatory domain 1 binding factor 1*) y PRDM2/RIZ (*retinoblastoma interacting zinc finger*). El dominio PR es un dominio de interacción proteína-proteína que comparte gran homología de secuencia con las proteínas de *Drosophila* Supresor of var, Enhancer of Zeste y Trithorax (**SET**), que funcionan como factores reguladores de la estructura de la cromatina, regulando de esta manera la expresión génica (Huang et al., 1998).

Además del dominio PR, el factor de transcripción Prdm16 consta de dos dominios de unión al DNA; uno situado en el extremo N-terminal con siete dominios de dedos de zinc repetidos en tandem y otro en el extremo C-terminal con tres dominios de dedos de zinc dispuestos de la misma manera. Entre ambos, hay un dominio rico en prolinas y un dominio represor de la transcripción. Por último en el C-terminal existe un dominio ácido (Nishikata et al., 2003).

El gen *Prdm16* humano se descubrió por su implicación en la translocación t(1;3)(p36; q21) que se produce en la leucemia mieloide aguda (AML) y en el síndrome mielodisplásico. Esta translocación tiene como consecuencia la desregulación transcripcional del gen, transformándolo en oncogénico. En estas células se ha identificado una segunda isoforma del *Prdm16*, denominada **MEL1S** que no contiene el dominio PR. Se ha visto que la sobreexpresión de esta isoforma es capaz de inhibir la diferenciación inducida por el G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) de la línea celular mieloide murina L-G3 (Nishikata et al., 2003).

Varios trabajos publicados recientemente, han podido demostrar que Prdm16 es capaz de activar toda la batería de genes necesarios para la diferenciación de la grasa marrón a partir de pre-adipocitos. Para ello esta proteína actúa como un factor de transcripción dual capaz de reclutar proteínas correpresoras como tBCP y reprimir los genes determinantes para la diferenciación en grasa blanca, y por otro lado reclutar co-activadores como la proteína PGC- $\alpha$  para activar los genes implicados en la biogénesis mitocondrial y respiración no acoplada, específicos de la grasa marrón (Kajimura et al., 2008).

Otros trabajos publicados acerca del papel del *Prdm16* en la determinación de la grasa marrón muestran evidencias de que este gen es necesario y suficiente para inducir la diferenciación de precursores musculares a adipocitos de grasa marrón. Además, en este artículo se demuestra mediante experimentos de linaje celular que las células de la grasa marrón provienen de una población Myf5<sup>+</sup>, dando a entender que la grasa blanca y la marrón tienen distintos orígenes, y que ésta última proviene de una población de precursores que pueden diferenciarse en músculo o en grasa marrón (Seale et al., 2008).

El modelo de falta de función del gen se ha publicado recientemente (Bjork et al., 2010). En este estudio, los autores describen un ratón mutante *csp1* que presenta distintas malformaciones craneofaciales, de las cuales resaltan la micrognatia (hipoplasia mandibular) y un bloqueo de la fusión de los procesos palatales secundarios, en parte debidos a la malformación mandibular y a la elevación de la lengua que ocupa el lugar del paladar. El origen de este fenotipo es una mutación recesiva en el primer intrón del gen *Prdm16* que provoca la ablación del exón 7 y el subsiguiente cambio de fase de lectura en el exón 8, lo cual finalmente se traduce en una proteína truncada, que incluye el primer dominio PR y un dedo de zinc. En este trabajo se compara este modelo de ratón con otro generado por la empresa *Lexicon Genetics* (línea PRDM16<sup>GT683Lex</sup>), en el que la inserción de una construcción que incluye el gen *LacZ* en el intrón1 da



como resultado un fenotipo muy similar al de los mutantes *cps1*. No obstante, ensayos de *Western blot* indican que los mutantes *cps1* son mutantes hipomórficos que no abolen totalmente la producción de la proteína Wt, mientras los ratones de la línea *PRDM16*<sup>GT683Lex</sup> son mutantes nulos, que no sintetizan proteína detectable. En este trabajo, también analizan el patrón de expresión mediante tinción  $\beta$ -Galactosidasa, con un resultado parecido al mostrado en esta tesis, observándose señal a E11,5 en el cerebro anterior, cerebro posterior, en el ojo, prominencias nasales, maxilares y mandibulares, ganglios craneales y periféricos, y en el mesénquima de la extremidad. Sin embargo, en este trabajo se centran principalmente en la expresión del gen en el tejido orofacial, con señal intensa en el paladar secundario anterior, paladar primario, músculo de la lengua, e incisivos superiores (Bjork et al., 2010).

En cuanto a la señalización de este factor de transcripción, estudios de expresión “in vitro” demuestran que el producto de *Evi-1*, uno de los genes parálogos de *Prdm16*, inhibe la ruta del TGF- $\beta$ , uniéndose a SMAD3, uno de sus efectores transcripcionales (Kurokawa et al., 1998). En coherencia con esto, se ha comprobado en ensayos de doble híbrido, que *Prdm16* también es capaz de unirse a las proteínas SMADS (Warner et al., 2007). No obstante, a pesar de que Bjork y colaboradores, mediante ensayos de transcripción observan la incapacidad del mutante de *cps1* para inhibir la señalización por TGF- $\beta$ , esto no se corrobora en cortes histológicos, donde algunas de las dianas de TGF- $\beta$  tienen disminuidos los niveles de expresión (Bjork et al., 2010).

Una de las funciones del *Prdm16* más reveladoras descritas en el último año, es su implicación en el mantenimiento del cupo de células madre hematopoiéticas y de células madre neurales. Mediante el uso de la línea mutante de ratón *PRDM16*<sup>GT683Lex</sup>, se ha observado actividad  $\beta$ -galactosidasa en las células madre hematopoiéticas (HSCs) y en los progenitores multipotentes de los distintos linajes sanguíneos, pero no en las células más diferenciadas. De la misma manera, detectan actividad  $\beta$ -galactosidasa en las células madre neurales localizadas en la parte lateral de la zona subventricular del cerebro anterior. El número de HSCs se encuentra 20 veces reducido en hígado y bazo fetal y de neonatos, y experimentos de reconstitución de médula ósea en ratones irradiados, reflejan una reconstitución de linajes sanguíneos en el caso de los animales transplantados con *Prdm16*<sup>+LacZ</sup> y células Wt, pero no en los animales transplantados con células *Prdm16*<sup>LacZ/LacZ</sup>. A pesar de que hay cierto grado de reconstitución transitoria, los autores concluyen que el cupo de células HSCs en la médula está muy mermado. Así mismo, experimentos análogos utilizando HSCs del hígado fetal dan resultados similares.

El *Prdm16* también afecta al mantenimiento de células madre neurales procedentes de la zona subventricular, ya que cultivos “in vitro” de estas células demuestran una reducción en el tamaño de las neuroesferas en las células *Prdm16*<sup>LacZ/LacZ</sup> y también en el número de subclones generados por ellas, lo que indica un defecto en el proceso de auto-renovación de las células madre neurales. Ésta reducción en el número de células madre neurales va acompañada de una reducción en la proliferación y un aumento en la apoptosis, además de un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). En referencia a este último aspecto, los autores demuestran que la deficiencia del *PRDM16* baja la expresión del *Hgf*, implicado en la eliminación de los ROS; El tratamiento con HGF de cultivos de células madre neurales subventriculares mutantes rescata parcialmente el número de neuroesferas y baja los niveles de ROS.

La conclusión del artículo es que el factor de transcripción *Prdm16* regula el mantenimiento de células madre hematopoiéticas y neurales y en éstas últimas lo hace, al menos parcialmente a través de la disminución de los ROS (Chuiikov et al., 2010). En referencia a esto, se ha publicado muy recientemente un artículo que demuestra que la delección del factor de transcripción *Prdm16* provoca una bajada en el cupo de HSCs debido a un aumento de la apoptosis en estas células. Así mismo este factor regula la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en distintos procesos relacionados con el mantenimiento de las HSCs como la autorenovación, la señalización, regulación del ciclo celular y la apoptosis (Aguilo et al., 2011).

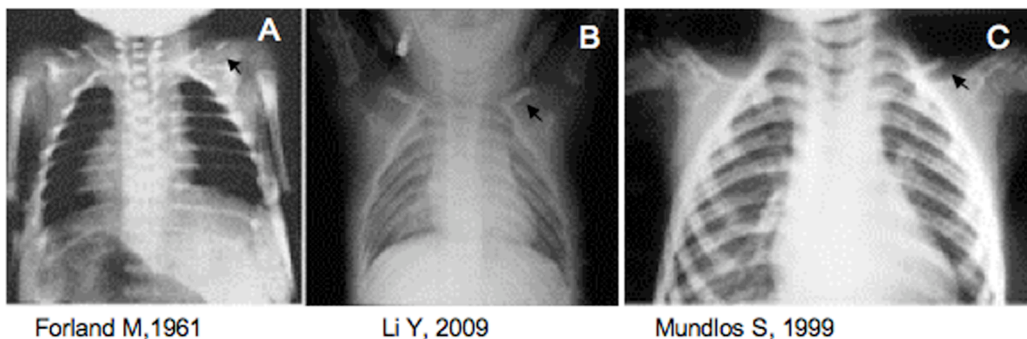
### 2. 7. 1. 3. 7. Síndromes humanos que afectan al desarrollo de la clavícula

Uno de los síndromes más conocidos que tiene afectado el desarrollo de la clavícula es la Cleidocraneal displasia (CCD). Éste es un síndrome autosómico dominante de alta penetrancia. Los individuos que lo sufren poseen hipoplasia de grado variable en ambas clavículas ó sólo en una; en muchos de los casos estudiados, el extremo que conecta con el acromion de la escápula muestra una osificación rudimentaria, aunque de forma menos común también puede ocurrir la desaparición de la parte medial ó la existencia de dos fragmentos separados, uno pegado al esternón y otro de la parte lateral. La agénesis completa de las clavículas es rara, pero hay algún caso descrito; las personas que carecen de ambas clavículas son capaces de juntar los hombros en la línea media del pecho. Otros signos diagnósticos que caracterizan a este síndrome son la separación de las fontanelas y las suturas craneales, y una hipoplasia del hueso parietal e interparietal causada por un retraso en la osificación de estos huesos. Otros defectos craneales son un tabique nasal rudimentario, engrosamiento segmental de la calvaria, maxila poco desarrollada, retraso en la unión de la sínfisis mandibular y una base craneal más pequeña con menor diámetro sagital y un gran foramen mágnum. El esqueleto apendicular también se encuentra modificado en este síndrome, con el segundo metacarpo y metatarso alargados, lo cual contrasta con el acortamiento de todos los demás huesos de la mano y del pie, incluidas las falanges mediales y distales del segundo dígito; esto se atribuye a un parada prematura del desarrollo de las placas de crecimiento. En la extremidad posterior algunos huesos de la cintura pélvica se muestran hipoplásicos. Las malformaciones orofaciales también son visibles en estos individuos que suelen tener el paladar abierto y un aumento en el número de dientes (Mundlos, 1999).

Un modelo genético de ratón que tiene interrumpido un alelo del gen *Runx2* reproduce la mayor parte de estas malformaciones (Otto et al., 1997) incluido el fenotipo clavicular comentado en párrafos anteriores y la reducción de los huesos parietal e interparietal y una separación de las suturas y fontanelas craneales (Otto et al., 1997).

Existen otros síndromes que afectan al desarrollo de las clavículas en humanos que presentan algunas similitudes con la *Cleidocranial displasia*. Uno de los más comunes es la Pseudoartrosis congénita que suele afectar solo a una de las clavículas. Existen otros más raros como la Picnodistosis en el que las clavículas son más densas debido a un defecto en los osteoclastos, las células encargadas de la reabsorción del hueso. Otros síndromes son la Progeria ,en el cual las clavículas son cortas y finas; El síndrome de *Sprengel deformity* en el cual tanto la clavícula y la escápula son hipoplásicas; El síndrome de Yunis-Varon, que se asemeja bastante a la CCD y que presenta ausencia ó hipoplasia de las clavículas; La displasia mandibuloacral también presenta ciertas similitudes con la CCD con clavículas hipoplásicas y separación de las suturas craneales (Hall, 2001).

**Fig. 11**



**Fig. 10\_Distintos casos de Hipoplasia clavicular en el síndrome de la Creidocranial displasia (CCD).**  
**A:** Ausencia de la parte central de la clavícula (flecha). **B:** Hipoplasia en el extremo lateral de la clavícula (flecha). **C:** Hipoplasia en el extremo lateral de la clavícula izquierda (flecha) y agénesis de la clavícula derecha.

## **2. 7. 2. El músculo**

Los precursores de las células musculares de la extremidad provienen de los somitos. Éstos nacen como bloques esféricos mesodérmicos a partir del mesodermo paraxial compuestos inicialmente por células epiteliales multipotentes que según avanza el desarrollo y siempre siguiendo una secuencia temporal antero-posterior van a ir especializándose para dar los precursores del músculo del tronco y extremidades; cartílago y hueso de vertebras y costillas; células endoteliales de los vasos de las extremidades y células de la dermis de la parte dorsal del tronco.

### **2. 7. 2. 1. Compartimentalización dorso-ventral del somito**

A medida que el somito va madurando se van formando distintos compartimentos. Gracias a las señales provenientes de los tejidos adyacentes se produce una compartimentalización dorso-ventral en la que se distinguen dos partes, una dorsal de carácter epitelial, el dermomiótomo que dará lugar a los precursores musculares del cuerpo y extremidades y a la dermis dorsal del tronco, y que se caracteriza por la expresión de los genes *Pax3* y *Pax7*, y otra ventral, que sufre una transición epitelio mesénquima para dar lugar al esclerotomo que constituirá la fuente de células cartilaginosas y óseas del esqueleto axial y expresa los genes *Pax1* y *Pax9*.

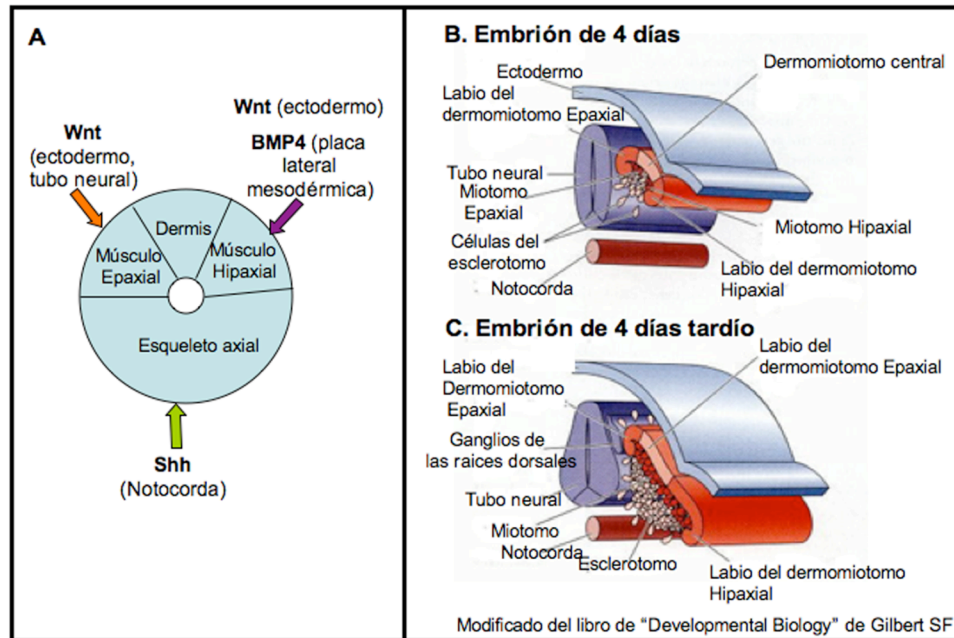
La formación y mantenimiento del dermomiótomo requiere señales del ectodermo, mientras que la inducción del esclerotomo se produce gracias a señales ventralizantes provenientes de la notocorda y tubo neural (Brand-Saberi et al., 1996c)

### **2. 7. 2. 2. Compartimentalización medio-lateral del somito**

A parte de la subdivisión dorso-ventral, la sucesiva especialización de las células de dermomiótomo conlleva una subdivisión medio-lateral, de manera que la parte medial (la más cercana al tubo neural) constituye el origen de la musculatura epaxial (músculo de la parte dorsal del tronco), mientras la parte lateral del dermomiótomo es el origen de la musculatura hipaxial (músculos de las extremidades, lengua y diafragma, así como de la pared del cuerpo). Mientras que la parte medial del dermomiótomo se induce por la acción de las señales procedentes de la notocorda y del tubo neural como SHH, la región lateral del dermomiótomo que dará lugar a la musculatura hypaxial, expresa marcadores como *Pax3* y proteínas de la familia Six, y se especifica gracias a señales provenientes de la somatopleura, como BMP4, y a proteínas de la familia Wnt procedentes del ectodermo. (Brand-Saberi et al., 1996c; Dietrich et al., 1998).

El primer músculo del cuerpo es el miótomo epaxial, una lámina situada justo debajo del dermomiótomo dorso-medial, el cual, en un momento del desarrollo, empieza a expresar genes de especificación muscular como *Myf5* que desencadenarán posteriormente la inducción de genes de diferenciación muscular como *MyoD* y miogenina, esenciales para la formación de estos primeros miocitos en el miótomo. En los somitos del flanco, el labio lateral del dermomiótomo expresa genes de especificación y diferenciación muscular y forma el miótomo hypaxial que junto con el dermomiótomo crece y se alarga adentrándose en la somatopleura y formando los músculos torácicos y abdominales.

**Fig. 12**



**Fig. 12. Diferenciación del somito**

**A:** Señales implicadas en la especificación dorso-lateral y medio-lateral del somito.

**B:** Distintos tejidos del somito de un embrión de pollo de 4 días.

**C:** Tejidos del somito en un embrión de pollo de 4 días tardío.

### **2. 7. 2. 3. Formación del músculo en las extremidades**

Existen dos tipos de musculatura hipaxial: aquella que inicia la diferenciación “in situ” en el dermomiótomo ventral en regiones del tronco derivadas de los somitos, y aquella cuya miogénesis se forma en lugares alejados del somito como la musculatura de las extremidades, lengua y diafragma; En este último caso, las células del labio dorso-lateral en los respectivos niveles axiales pierden su carácter epitelial y migran recorriendo largas distancias hasta su lugar de destino donde se expanden e inician la expresión de genes de especificación y diferenciación muscular.

#### **2. 7. 2. 3. 1. Migración de los precursores musculares a la extremidad**

Una de las moléculas clave para la delaminación de los precursores musculares del labio ventro-lateral del dermomiótomo es el factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor* ó *HGF*) de la familia de las citoquinas que se expresa en el mesénquima de la extremidad, y su receptor cMet de la familia de los receptores tirosina-quinasa; este último, sin embargo, no se expresa solo en la población migratoria del dermomiótomo, sino en todos los precursores de la musculatura hipaxial, lo cual concuerda con el hecho de ser una diana directa de Pax3 (Epstein et al., 1996). Estudios de pérdida de función en ratones han demostrado que la deficiencia en *cMet* ó en su ligando no afectan a la especificación de esta población migratoria pero sí a su delaminación, y por tanto, las células permanecen agregadas incapaces de dispersarse hacia sus lugares de destino (Dietrich et al., 1999). La aplicación ectópica del ligando HGF en regiones del flanco provoca la delaminación de células del labio lateral del dermomiótomo (Brand-Saber et al., 1996b)

No se conoce la señal molecular que induce el potencial migratorio de estas células, pero sí existen genes que sólo se expresan en estas células y que resultan imprescindibles para su migración. Uno de estos genes es *Lbx1*, gen homeobox de la familia del gen *Ladybird* de *Drosophila*, que se expresa únicamente en esta población migratoria dentro del somito y también en las células en proceso de migración. Los ratones deficientes en este factor de transcripción muestran una migración aberrante y los precursores musculares aparecen en lugares ectópicos de la placa lateral mesodérmica (Schafer and Braun, 1999; Brohmann et al., 2000).

La regulación de la adhesión celular durante la migración es fundamental para permitir la movilidad celular. En el embrión de pollo, se ha observado que la proteína de adhesión N-caderina, promueven la migración de las células musculares interactuando con las células vecinas y con proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina. (Brand-Saber et al., 1996a).

Una vez penetran en la extremidad, los precursores musculares se sitúan en el mesénquima dorsal y ventral evitando el mesénquima más distal, el mesénquima central y la parte anterior y posterior de la extremidad. La formación de estas dos masas musculares requiere de la actuación de moléculas de atracción y repulsión que guíen a estos precursores y permitan su correcta localización, primer paso para que la diferenciación y la formación de las fibras musculares transcurra adecuadamente. Una de estas moléculas es el receptor tirosina-quinasa Eph4 que se expresa en los precursores musculares que migran desde el somito, mientras su ligando, la efrina A5 se expresa en el mesénquima de la extremidad. Se ha demostrado, que la expresión ectópica del ligando en el mesénquima proximal de la extremidad, provoca la repulsión de las células que migran desde el somito, y por tanto, muchos menos precursores son capaces de llegar a la extremidad. La conclusión de este trabajo es que estas dos moléculas constituyen señales repulsivas que evitan probablemente la migración aberrante de las células a zonas más distales (Swartz et al., 2001; Vasyutina and Birchmeier, 2006)

Otra de las moléculas importantes implicadas en el proceso de migración de los precursores musculares dentro de la extremidad es el receptor de quimioquinas CXCR4, que se expresa en una subpoblación de precursores musculares que expresan *Pax3* pero no *MyoD*. Su ligando, el *SDF1* se expresa en el mesénquima central de la extremidad; se ha comprobado que la colocación de "pellets" de células COS que sobreexpresan la quimioquina en lugares ectópicos provoca la migración de las células CXCR4+ hacia esas regiones, además de evitar su diferenciación. Sin embargo, los mutantes del receptor *CXCR4* tienen sólo defectos muy sutiles en la musculatura de la extremidad.

Se sabe que la proteína GAB1 es un adaptador de la vía de señalización del receptor cMet y que los mutantes en esta proteína tienen defectos en la migración de la musculatura hypaxial. Sorprendentemente los dobles mutantes *CXCR4/GAB1* tienen unos defectos más severos en la supervivencia y migración de los precursores musculares que los mutantes individuales, por tanto, aunque los receptores de quimioquinas y los receptores tirosina-quinasa utilizan distintas vías de señalización se sabe que comparten algunos efectores como son la vía de Ras/MAPK y la de PI3K/AKT, por lo que podrían tener efectos sinérgicos sobre la migración y supervivencia de los precursores musculares. (Vasyutina et al., 2005a).

## **2. 7. 2. 3. 2. Control de la miogénesis en la extremidad**

Al llegar a la extremidad, los precursores musculares *Lbx1+* *Pax3+* se disponen en sendas poblaciones subectodérmicas en el mesénquima dorsal y ventral. Poco después de colonizar esta estructura, estas células apagan la expresión de *Lbx1* y comienzan a expresar genes de especificación de músculo como *Myf5*, factor de transcripción de la familia bHLH cuya expresión colocaliza con la expresión de *Pax3* en las dos poblaciones de precursores musculares subyacentes al

ectodermo. La expresión de éste último parece estar controlada, al menos parcialmente por Pax3. Más tarde esta población en expansión cesa la proliferación y comienza a expresar *MyoD* (en ratón, *MyoD* se expresa también en células en proliferación), factor de transcripción también de la familia bHLH, implicado en la diferenciación de los precursores musculares, y cuya señal se detecta más cerca al mesénquima central que la de Pax3 (Delfini et al., 2000; Buckingham et al., 2003).

De todos estos factores que intervienen en la miogénesis, Pax3 es esencial para la especificación de los precursores de la musculatura hypaxial, cómo ya se ha comentado anteriormente, mientras que MyoD, Myf5 y MRF4 pertenecientes a la familia de factores de transcripción bHLH, son factores de determinación muscular, capaces de transformar esos precursores multipotentes del dermomiótomo en mioblastos y promover su diferenciación mediante la inducción de proteínas de diferenciación muscular como la miogenina. A pesar de que cada uno de estos factores tiene una secuencia de activación espacio-temporal particular, cualquiera de ellos es capaz de compensar, al menos en parte, la falta de función de los otros durante la miogénesis embrionaria. La supresión de la actividad de estas tres proteínas provoca la abolición total de mioblastos y de fibras musculares (Kassar-Duchossoy et al., 2004). La generación de mutantes de estos genes ha demostrado que su secuencia de activación en el tronco y la extremidad es distinta. Mientras que en el tronco Myf5 y Pax3 en la parte medial y lateral del somito, respectivamente, son capaces de inducir *MyoD*, en la extremidad, los primeros parecen actuar en una vía de señalización distinta que el último (Kablar et al., 1997). Una de las evidencias de que esto ocurre así la demuestra el mutante de *Mox2* otro de los genes que se expresan en los precursores musculares de la extremidad en el que se ven afectados los niveles de expresión de Pax3 y Myf5, mientras que la expresión de MyoD se mantiene (Mankoo et al., 1999).

Las proteínas de la familia Six también actúan como reguladores de la miogénesis en distintas etapas del proceso; por un lado contribuyen a la expresión de Pax3 en el dermomiótomo y por otro son capaces de activar la transcripción de Myf5 en los precursores musculares de la extremidad (Grifone et al., 2005; Giordani et al., 2007).

El balance entre la proliferación y diferenciación muscular es fundamental, ya que la descompensación de una ó de otra puede provocar la aparición de anomalías en el patrón muscular ó incluso pérdidas selectivas de algún músculo en concreto.

Se ha visto que factores procedentes del ectodermo son importantes en el mantenimiento de este equilibrio. Existen evidencias de que proteínas pertenecientes a la familia de las BMPs son piezas clave en este proceso; Experimentos realizados por Amthor y colaboradores demuestran que la ablación del ectodermo dorsal provoca una bajada drástica de los niveles de expresión de Pax3 y aumenta la intensidad y el dominio de expresión de MyoD, efecto que es rescatado al poner bolas con bajas concentraciones de BMPs en el mesénquima dorsal. Sin embargo, las altas concentraciones de BMPs provocan la abolición tanto de la expresión de Pax3 como de MyoD debido principalmente a la apoptosis de estas células. De este modo se postula que este grupo de proteínas que se expresa en el ectodermo, en los márgenes anterior y posterior del mesénquima, y en el mesénquima distal, proporciona tanto señales mitogénicas procedentes del ectodermo, cómo señales apoptóticas en las zonas no miogénicas de la extremidad. En la región central del mesénquima la expresión de antagonistas de BMPs como la noguina favorecería la diferenciación de los mioblastos (Amthor et al., 1998).

Otro trabajo describe que la proteína secretada Wnt6, se expresa fuertemente en el ectodermo y promueve la proliferación de las células musculares inhibiendo su diferenciación (Geetha-Loganathan et al., 2005).

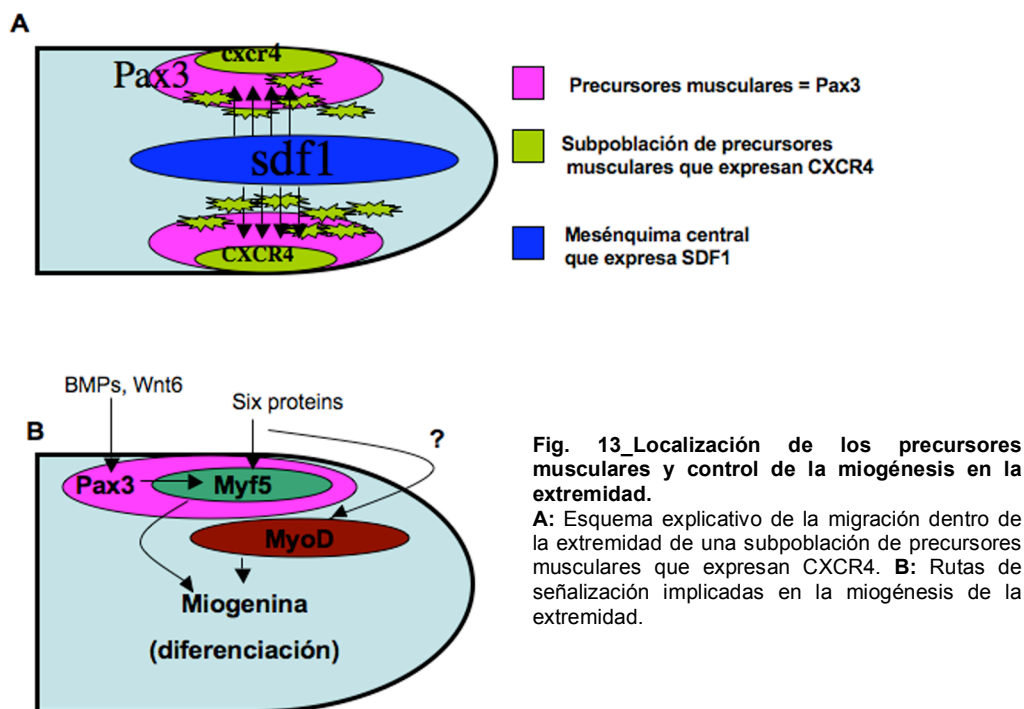
No obstante, las vías de proliferación y diferenciación están sometidas a una fina y compleja regulación en la que parecen influir múltiples factores. Además de los niveles de BMPs procedentes del ectodermo mencionados anteriormente, la vía de Notch y la vía de los FGFs afectan a la transición de mioblastos a miocitos.

Durante la miogénesis en la extremidad, el ligando de Notch, *Delta1* se expresan células en proceso de diferenciación, mientras el receptor se expresa en células más inmaduras; la sobreexpresión del ligando en el mesénquima resulta en una bajada de expresión de *MyoD* en las células que expresan el receptor, no afectando a la de *Pax3* y *Myf5*, con lo que se demuestra que la vía de Notch impide la diferenciación terminal de los mioblastos (Delfini et al., 2000).

Los Fgfs y sus receptores se expresan en las células musculares de la extremidad, y, estudios "in vitro", han demostrado su implicación tanto en la proliferación de los precursores musculares como en la promoción de la miogénesis. Estudios de falta de función "in vivo" mediante la infección de mioblastos con el dominante negativo del FGFR1 en el embrión de pollo, muestran una reducción de la masa muscular y una bajada en la densidad de las fibras musculares debido a una diferenciación prematura de los mioblastos (Flanagan-Steet et al., 2000).

También la proteína difusible SHH actúa como factor mitogénico de los precursores musculares de la extremidad. Estudios "in vitro" que la adición de esta proteína produce un aumento de la proliferación en los cultivos de mioblastos primarios. Además, la sobreexpresión de *Shh* mediante retrovirus en el primordio de la extremidad, incrementa el dominio de expresión de *Pax3* y *MyoD*, provocando una hipertrofia muscular (Duprez et al., 1998).

**Fig. 13**



### 2. 7. 2. 3. 3. Formación del patrón de fibras musculares en la extremidad

Inmediatamente después de su diferenciación, los miocitos se fusionan en miotubos multinucleados, que a su vez se unen para formar las fibras musculares. Por lo tanto, la formación del patrón muscular y la diferenciación de los mioblastos son sucesos íntimamente ligados, ya que, en el momento que la célula se diferencia, adopta una orientación determinada que prefigura la orientación y características de cada futuro músculo.

Trabajos clásicos han sugerido la idea de que el tejido conectivo contenía información esencial para la organización del patrón muscular (Grim and Wachtler, 1991). Recientemente, se ha descubierto que el *Tcf4*, uno de los efectores transcripcionales de la vía canónica de Wnt se expresa en el tejido conectivo muscular y forma un pre-patrón que sirve de guía para la diferenciación de los miotubos en el lugar preciso. La activación constitutiva de la vía de Wnt en el mesénquima mediante infección con adenovirus y retrovirus, induce la sobreexpresión de *Tcf4* y como consecuencia la formación de miotubos en lugares ectópicos; por el contrario, la sobreexpresión de un dominante negativo del *Tcf4* en el mesénquima da como resultado la pérdida de miotubos, músculos truncados, y en los casos más extremos, desaparición de músculos enteros (Kardon et al., 2003).

La confirmación del papel crucial del tejido conectivo muscular en el patrón de las fibras musculares queda ilustrada en un trabajo reciente en el que la deficiencia de los genes *Tbx5* y *Tbx4*, en la extremidad anterior y posterior respectivamente, resulta en una disgregación del tejido conectivo muscular y como consecuencia defectos generalizados en el tamaño de los músculos, en sus bifurcaciones y también en los puntos de origen e inserción en el hueso. Un análisis más profundo de las proteínas de adhesión celular de este tejido conectivo, indica la pérdida de la  $\beta$ -catenina en la membrana de las células, ligada a una bajada de la expresión de N-cadherina; Por tanto, la insuficiente asociación de las células del tejido conectivo provoca la subsiguiente desregulación de los haces musculares. Los factores de transcripción homeobox *Tbx4* y *Tbx5* son esenciales para la inducción de la extremidad aunque, como certifica este trabajo, su expresión en estadios más tardíos parece estar relacionada con la morfogénesis de músculos y tendones (Hasson et al., 2010). Se ha sugerido que muchas de las diferencias en el fenotipo muscular entre la extremidad anterior y superior observadas en algunos mutantes como *Mox2* ó *Lbx1* podrían explicarse por la intervención de estos genes en la formación de los músculos individuales.

### **2. 7. 3. Tendones**

Los tendones son un tipo de tejido conectivo especializado que conecta el músculo con el hueso, transmitiendo la fuerza generada por la contracción muscular al esqueleto.

El tejido tendinoso está constituido por filas de fibroblastos (tenocitos) intercaladas con fibras de colágeno distribuidas longitudinalmente; esta organización característica de la matriz extracelular (ECM), además de la particular combinación de sus componentes, es lo que los diferencia de otros tejidos conectivos de similar composición molecular.

Un marcador clásico de tendones es la tenascina, una proteína de ECM, aunque ésta no es del todo específica porque también marca otros tejidos como nervios, cartílago y pericondrio; Otro inconveniente de este marcador es que comienza a detectarse a partir de 24HH y por tanto no identifica los precursores de los tendones antes de ese estadio (Kardon, 1998).

En la última década se ha avanzado mucho en el estudio de este tejido gracias a la identificación de Scleraxis, factor de transcripción de la familia bHLH que marca específicamente tendones y ligamentos y también sus células precursoras desde estadios muy tempranos. Éste factor marca tanto los tendones del tronco como los de la extremidad a pesar de que ambos tienen diferentes orígenes. Los tendones de la extremidad provienen de la placa lateral mesodérmica, mientras que los tendones del tronco se originan de la parte dorsal del esclerotomo, compartimento que ha sido denominado sindetomo (Brent et al., 2003).



### **2. 7. 3. 1. Formación de los tendones en la extremidad**

Los precursores de los tendones que forman la extremidad provienen de la placa lateral mesodérmica y su desarrollo se ha estudiado siguiendo la expresión de *Scleraxis* (*Sclx*), factor de transcripción que se expresa en estas células desde su aparición hasta su diferenciación en tendones maduros.

En el embrión de pollo, los primeros precursores de los tendones se observan a estadio 21HH y se disponen en sendas poblaciones subectodérmicas en el mesénquima ventral y dorsal (Schweitzer et al., 2001). Estas dos poblaciones co-localizan con los precursores musculares provenientes del dermomiótomo; no obstante, el análisis de *scleraxis* en mutantes *Spotch* (que carecen de células musculares en la extremidad), y de extremidades de pollo cultivadas en ausencia de mioblastos, demuestran que el desarrollo temprano de los precursores de tendones no depende de los precursores musculares y que constituyen poblaciones distintas (Kardon, 1998).

Al contrario que en el tronco, aún no se conocen las señales que promueven la expresión de *Scleraxis* en la extremidad, aunque se sabe que la ablación del ectodermo dorsal antes de la aparición de la expresión de *Scleraxis* evita su inducción en la extremidad del pollo; por tanto parece que señales ectodérmicas podrían estar implicadas al menos parcialmente en la inducción de los precursores de tendones (Schweitzer et al., 2001). Se ha postulado que miembros de la familia de las BMPs podrían actuar como señales reguladoras de este factor de transcripción. Éstas proteínas se expresan en los márgenes de la extremidad, zonas de exclusión de los precursores de los tendones. Tanto experimentos de inyección de virus que sobreexpresan BMPs como la implantación de bolas impregnadas de proteína recombinante en el esbozo de la extremidad del pollo, dan como resultado una bajada de la expresión de *Scleraxis*, apoyando la hipótesis de un posible efecto inhibidor de las BMPs sobre la especificación de los precursores de los tendones (Schweitzer et al., 2001).

Sorprendentemente, a pesar de la expresión temprana de *Scleraxis* en las células precursoras de los tendones, los ratones deficientes en esta proteína no tienen afectada la etapa temprana de especificación de los tenocitos pero sí la etapa de diferenciación de estas células, observándose defectos severos en los tendones largos encargados de transmitir la fuerza mecánica al hueso y en los tendones intermusculares (cómo los del diafragma); en cambio, los tendones de inserción de los músculos no se ven afectados (Murchison et al., 2007).

### **2. 7. 3. 1. 1. Morfogénesis de los tendones de la extremidad**

Según avanza el crecimiento de la extremidad, las dos masas celulares subectodérmicas que expresan *scleraxis* se van a subdividir en tres primordios proximo-distales:

Un primordio proximal entre el “muslo” y la “espinilla” (estilopodio y zeugopodio) a la altura de la rodilla, otro primordio intermedio entre la “espinilla” y el “pie” (entre zeugopodio y autopodio) y un primordio distal en el “pie” (autopodio). Estos primordios a su vez se subdividirán en tendones individuales que formarán interconexiones con el músculo y el hueso (Kardon, 1998).

La morfogénesis de los tendones se ha estudiado preferentemente en el autopodio, donde se diferenciarán tendones dorsales (extensores) y ventrales (flexores). Existen algunas diferencias entre los tendones distales y el resto de los tendones de la extremidad que han apoyado la idea de que el autopodio es una neoforma evolutiva con características específicas. Una de las particularidades del autopodio respecto a partes más proximales es que la generación de tendones individuales es independiente del músculo, aunque estos necesiten señales musculares para su posterior

supervivencia (Kardon, 1998). Sin embargo, parece haber una relación directa entre la formación de los elementos condrogénicos y los tendones distales (Hurle et al., 1990). Otra diferencia importante del autopodio es la formación de una lamina de matriz extracelular llamada lamina mesénquimal, paralela a la membrana basal que sirve como entramado de apoyo para la formación y organización de los blastemas de los tendones (Hurle et al., 1989; Ros et al., 1995).

La formación de los tendones distales se ha estudiado en la pata del embrión de pollo, y en ella se pueden distinguir 6 fases:

**I:** En la primera fase se produce un engrosamiento del ectodermo y las células mesenquimales subyacentes a la membrana basal exhiben procesos celulares.

**II:** En la segunda fase se observa ya la formación de una matriz extracelular que se extiende desde el ectodermo hasta la condensación condrogénica, y se denomina lámina mesenquimal. Ésta no es más que la lamina reticular que va siendo desplazada por las células mesenquimales subyacentes que se interponen entre la lamina densa y la lamina reticular y cuyas fibras de colágeno adquieren una disposición longitudinal característica.

**III:** Estas células comienzan a condensarse alrededor de la lamina mesenquimal.

**IV:** Las células se siguen condensando y secretando matriz extracelular formando cada vez una estructura más compacta y redondeada.

**V-VI:** Se forma una capa de células aplanadas alrededor del blastema llamada epitenon que constituye la capa celular que rodea a los tendones maduros. (Ros et al., 1995).

Las propiedades mecánicas que tienen los tendones vienen dadas por la composición y organización de la ECM. La secreción y ensamblaje de todos estos componentes se lleva a cabo por fibroblastos especializados (tenocitos) que se colocan en filas entre las cuales se disponen las fibras de colágeno. El ordenamiento de las células es una propiedad intrínseca que las diferencia de otros fibroblastos como los de la retina ó los de la piel. El componente más abundante de la matriz celular de los tendones es el colágeno tipo I; no obstante existen otros tipos de colágeno implicados en el ensamblaje del colágeno tipo I como el colágeno tipo III, ó los colágenos tipo XII y XIV localizados en la superficie de las fibrillas, además de distintos proteoglicanos que también participan en el ensamblaje de las fibrillas y maduración de los tendones (Edom-Vovard and Duprez, 2004). Además del sistema de fibras de colágeno, la ECM está compuesta de fibras elásticas cuya organización consiste en un sistema de microfibrillas de fibrillina que sirven como entramado para el anclaje de moléculas de elastina (Rosenbloom et al., 1993).

#### **2. 7. 4. Interconexiones del sistema músculo-esquelético en la extremidad**

Se ha demostrado que la morfogénesis del músculo, de los tendones y el hueso está temporalmente y espacialmente asociada.

Como ya se ha comentado anteriormente, la morfogénesis de los tendones se inicia con una masa celular dorsal y ventral que expresa el marcador *Scleraxis* que más tarde se subdivide en tres primordios, de los que luego emergen los distintos tendones: primordio proximal, intermedio y distal. Inicialmente, los precursores musculares identificables como dos masas celulares que expresan el marcador *Pax3* co-localizan con los precursores de los tendones, sin embargo, según estos mioblastos se van diferenciando y formando miotubos, se sitúan de en un patrón de fibras estereotipado entre los tres primordios de los tendones. De manera que las fibras musculares del muslo se forman en una localización proximal al primordio de tendones proximal, las fibras musculares de la espinilla se forman entre el primordio proximal e intermedio, y los miotubos del autopodio se forman entre el primordio intermedio y el primordio distal. Aunque se forman entre los primordios de los tendones, estas masas musculares son inicialmente continuas, pero alrededor de HH30,

estás se individualizan. Ésta interrelación espacial inicial de músculos y tendones, posteriormente se traduce en una conexión anatómica; el primordio proximal dará lugar a los tendones que se insertan en los músculos del muslo y los tendones de origen de los músculos de la espinilla, los tendones procedentes del primordio intermedio constituyen los tendones de inserción de los músculos de la espinilla y los tendones de origen de los músculos del autopodio, mientras que el primordio distal dará lugar a los tendones de inserción de los músculos del autopodio y a algunos tendones de inserción de músculos de la espinilla que se insertan en las falanges.

Alrededor de HH26, las masas musculares comienzan a subdividirse para formar músculos individuales siguiendo una secuencia proximo-distal desde los tendones de inserción, ó distal-proximal desde los tendones de origen. También los tendones comienzan a subdividirse desde sus extremos de origen ó inserción de las masas musculares. En el caso del primordio distal, antes de que se formen los tendones individuales, éste se divide en 4 blastemas asociados con los 4 dígitos.

Los tendones que se insertan en las falanges y en los que convergen los músculos de la espinilla y los del pie, proceden de distintos segmentos que luego se unen; la parte proximal de estos tendones procede del primordio intermedio y/o distal, la parte distal proviene de extensiones dorsales y ventrales de tejido tendinoso procedente de las uniones entre los huesos de los metatarsos y las falanges y de las uniones entre las falanges. Inicialmente estos segmentos están separados, pero gradualmente se unen los segmentos distales con los derivados del primordio intermedio a la altura de la tibia, y los segmentos distales con las extensiones de tejido dorsales y ventrales procedentes del cartílago.

El último paso del ensamblaje del sistema músculo-esquelético es el anclaje de los tendones a sus sitios de origen e inserción en el cartílago. Estas conexiones difieren tanto en el momento, como en el sitio de anclaje de los tendones dependiendo del nivel proximo-distal del primordio. El primordio de tendones proximal se extiende hacia el fémur, tibia y fíbula desde el momento en que comienza a ser visualizado, contactos que se refinarán en el transcurso de la individualización de los tendones. Los tendones que unen los músculos de la espinilla (ó gemelo en el caso del primordio ventral) a la región de los tarso-metatarsos proceden del primordio intermedio e inicialmente se localizan superficialmente pegados al ectodermo; tras la individualización de sus músculos asociados, estos tendones se extienden hacia el mesénquima central para insertarse en sus lugares correspondientes en el cartílago. La inserción de los tendones que conectan los músculos de la espinilla y del “pie” con las falanges, está retrasada respecto a los demás tendones concordando con la tardía aparición de los elementos cartilaginosos distales. Como ya se ha comentado con anterioridad, estos tendones proceden de varios segmentos separados, que al unirse, forman las conexiones con el cartílago (Kardon, 1998).

### Dependencia entre los tendones y el músculo durante el desarrollo de la extremidad

La asociación espacio-temporal de las masas musculares y tendinosas, ha conducido a la realización de estudios para analizar la dependencia de estos dos tejidos durante el desarrollo de la extremidad tanto en pollo como en ratón.

Para ello se cultivaron primordios de extremidades de pollo en el celoma antes de la migración de células musculares del somito, generando así patas carentes de musculatura. En estas extremidades los primordios de los tendones aparecen autónomamente en una secuencia espacio-temporal normal (Kardon, 1998). Esta observación se repite en el embrión de ratón, donde los mutantes de *Pax3*, que carecen de células musculares en la extremidad, son capaces de formar los primordios de los tendones normalmente (Tozer and Duprez, 2005).

No obstante la dependencia del músculo en las sucesivas etapas de segregación de los tendones individuales varía en el eje proximo-distal. Los primordios proximal e intermedio no son capaces de segregarse en tendones individuales en ausencia de músculo, y acaban degenerando. Por el contrario, el primordio distal se subdivide normalmente, a pesar de

que estos tendones también sufren una degeneración gradual si no realizan las pertinentes conexiones con el músculo (Kardon, 1998).

Para estudiar la dependencia del músculo respecto a los tendones se realizaron experimentos de ablación quirúrgica del primordio proximal dorsal. Dos días después de la operación (HH28-29), aparecían miotubos ectópicos entre las masas musculares del muslo y la espinilla, en una región periférica encima de la rodilla. Estos experimentos sugieren que los primordios de los tendones, que se desarrollan entre las masas musculares, son importantes para el correcto posicionamiento de éstas (Kardon, 1998).

**Fig. 14**

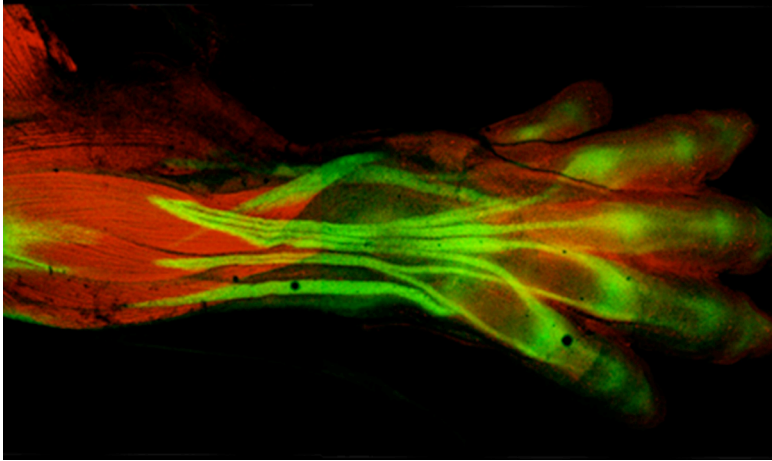


Imagen reproducida del laboratorio de Malcom Logan

**Fig. 14** Imagen de microscopía confocal del zeugopodio y autopodio de la extremidad de un embrión de ratón mostrando las fibras musculares (rojo) y los tendones (verde)

## **2. 7. 5. La vasculatura**

El sistema vascular inicia su diferenciación en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Los precursores endoteliales aparecen ya durante la gastrulación en el mesodermo lateral y mesodermo posterior (que va a dar el mesodermo extraembrionario).

Estas células mesodérmicas migran al saco vitelino donde formarán unos agregados capaces de diferenciarse tanto en células endoteliales como en células de la sangre; debido a su carácter vasculogénico y hemogénico estos precursores se denominan hemangioblastos. En estos agregados se produce la segregación de dos linajes: uno de células aplanadas que se disponen en la periferia constituyendo las primeras células endoteliales, y, otro en el centro, constituido por precursores sanguíneos (fundamentalmente precursores de eritrocitos primitivos); estos primeros vasos rudimentarios reciben el nombre de *blood islands*. La fusión de estos vasos forma el plexo primitivo del sistema vascular rudimentario y permiten el inicio del flujo sanguíneo una vez empieza a latir el corazón (12HH en el embrión de pollo). Este sistema será posteriormente remodelado para dar el sistema circulatorio extraembrionario maduro.

La generación de los precursores endoteliales y hematopoiéticos en el mesodermo lateral y posterior del embrión temprano va asociada a la expresión del receptor del factor de crecimiento vascular VEGFR2, cuya función es esencial en todas las etapas del desarrollo de la vasculatura ya que, en etapas más avanzadas del desarrollo, su expresión se restringe a células endoteliales de todo tipo de vasos sanguíneos así como de vasos linfáticos. Los ratones deficientes en el receptor VEGFR2 ó en su ligando VEGF mueren en útero entre día 8,5 y 9,5 con defectos tempranos en el

desarrollo de células endoteliales y precursores hematopoiéticos y como consecuencia también carecen de *blood islands*.

En el embrión, se diferencian pequeños capilares que se fusionaran dando lugar al plexo primitivo. Estos primeros vasos se forman por un proceso denominado vasculogénesis, caracterizado por la diferenciación “in situ” de células mesénquimales en células endoteliales y su agregación para formar estructuras tubulares de “novo”. Una vez formado el plexo primitivo, el plexo vascular crece e invade nuevos tejidos mediante un proceso llamado angiogénesis, consistente en el crecimiento de vasos a partir de un vaso preexistente mediante los fenómenos de ramificación, subdivisión, crecimiento y anastomosis (Eichmann et al., 2005).

Durante la organogénesis, la vasculatura visceral se forma por vasculogénesis a partir de la diferenciación de precursores endoteliales derivados del mesotelio, mientras que la vasculatura de la somatopleura se forma inicialmente por vasculogénesis a partir de angioblastos derivados del mesodermo paraxial, y posteriormente coloniza los tejidos circundantes por angiogénesis (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1995; Pardanaud et al., 1996; Pudliszewski and Pardanaud, 2005), aunque se ha descrito que también existe un componente vasculogénico durante esta fase del proceso (Ambler et al., 2001). Los tejidos cuyas células endoteliales derivan del mesodermo somítico/paraxial son el tubo neural, el mesonephros, las extremidades, la pared del cuerpo, venas cardinales y parte dorsal y lateral de la aorta. (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1995; Wilting et al., 1995; Pardanaud et al., 1996),

### **2. 7. 5. 1. La vasculatura de la extremidad**

La vasculatura de la extremidad se empieza a formar como un plexo capilar inmediatamente después de la inducción de ésta, alrededor de estadio 17HH, y por tanto, es el primer tejido diferenciado en aparecer en esta estructura.

Los vasos de la extremidad se forman mayoritariamente por angiogénesis a partir de los vasos intersomíticos (provenientes de la aorta dorsal) y se nutren de células endoteliales derivadas del mesodermo paraxial/somítico (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1995; Wilting et al., 1995; Pardanaud et al., 1996). Sin embargo, existen varios trabajos en los que se describe la presencia de angioblastos en el mesénquima de la extremidad que también parecen intercalarse en los vasos, mediante un proceso de vasculogénesis, aunque no se sabe en qué grado contribuyen al crecimiento total de los vasos (Brand-Saberi et al., 1995).

El origen somítico de las células endoteliales de la somatopleura, se demostró gracias a la generación de quimeras pollo/codorniz en las que se demuestra la potencialidad del somito indiferenciado para dar células endoteliales, que, poco a poco, se va restringiendo a su parte dorso-lateral, hasta que en el somito diferenciado se limita a la parte lateral del dermomiótomo y esclerotomo, como indica la expresión del receptor VEGFR2 en esta región (Nimmagadda et al., 2004; Nimmagadda et al., 2005; Nimmagadda et al., 2007). Según va creciendo la extremidad, el plexo vascular se hace más denso y en el centro del eje antero-posterior se forma la arteria subclavia, el vaso de mayor calibre de la extremidad anterior. A lo largo del eje antero-posterior se forma la vena marginal que tiene un componente posterior más prominente, debido a un crecimiento mayor del mesénquima de este eje (Vargesson et al., 1997), y un componente anterior que confluyen en un plexo capilar distal (Wilson, 1983).

No toda el primordio de la extremidad está vascularizado, sino que debajo del ectodermo, existe una zona de mesénquima avascular que ocupa 100-120µm (Caplan and Koutroupas, 1973). A pesar de la carencia de vasos estructurados en esta zona, varios trabajos han constatado la existencia de angioblastos aislados en estado quiescente. La relevancia de estas células en esta región es aún desconocida, pero se sabe que al transplantar un trozo de zona avascular a otras zonas del embrión con permisividad para formar vasos, esos angioblastos son capaces de

diferenciarse en células endoteliales, migrar y formar parte de los vasos del embrión huésped (Feinberg and Noden, 1991).

## **2. 7. 5. 1. 1. Formación del patrón vascular en la extremidad**

### **Influencia del ectodermo sobre la vasculatura**

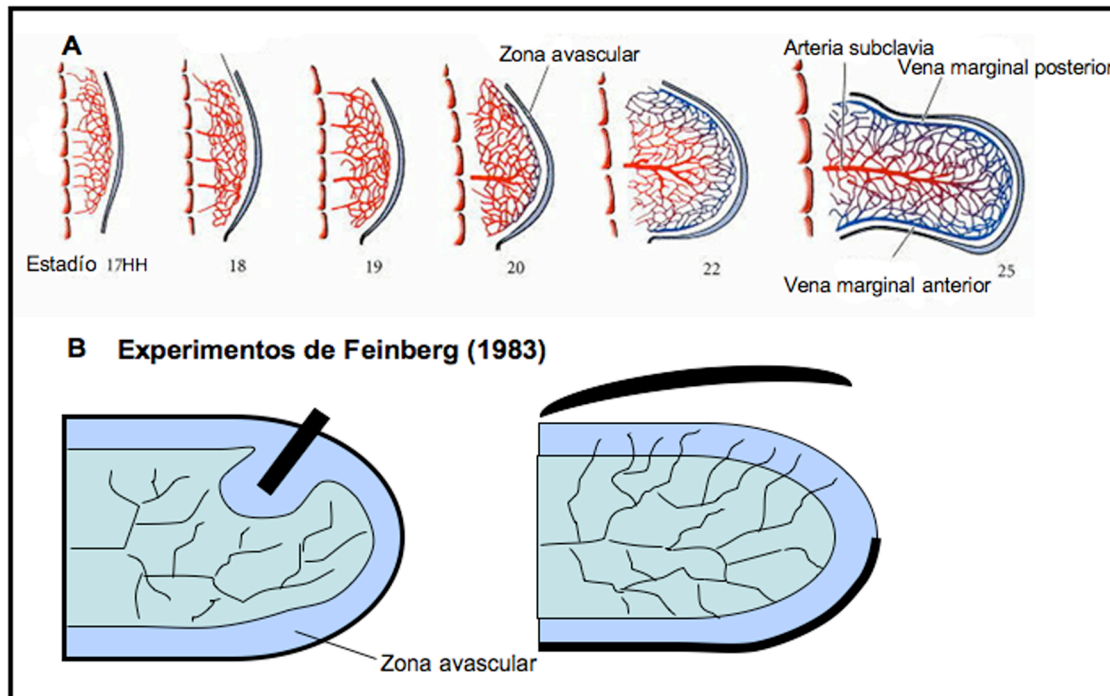
Como ya se ha comentado anteriormente, existe una zona libre de vasos justo debajo del ectodermo tanto en la extremidad como en el resto del cuerpo del embrión (Caplan and Koutroupas, 1973). Para demostrar la implicación del ectodermo en la inhibición del crecimiento vascular en esta región, Feinberg y colaboradores realizaron experimentos en los que insertaban trozos de ectodermo de la piel de la espalda del embrión en el seno vascular del primordio de la extremidad; el resultado era la formación de una región avascular del mismo grosor que la subyacente al ectodermo endógeno. En cambio, si insertaban un trozo del epitelio pigmentoso de la retina, no veían esa inhibición de vasos alrededor del inserto. Estos resultados eran coherentes con la existencia de una región avascular debajo del ectodermo de la espalda del embrión y la ausencia de esta región en el epitelio pigmentoso en contacto con el plexo vascular. Los autores de este trabajo también comentan como se produce una expansión de los vasos de la extremidad hacia la periferia al retirar el ectodermo (Feinberg et al., 1983).

El mecanismo molecular mediante el cual el ectodermo ejerce esta inhibición no se conoce, pero sí se ha demostrado que hay una correlación directa entre los ectodermos que secretan una gran cantidad de ácido hialurónico a la matriz extracelular subyacente y la formación de esta región avascular. Los ectodermos que no son ricos en este glicosaminoglicano no son capaces de inhibir la formación de vasos en el espacio subyacente. Además, se ha comprobado que la implantación de un material inerte impregnado con ácido hialurónico es suficiente para inducir avascularidad en el mesénquima (Feinberg and Beebe, 1983).

### **Influencia del AER sobre la vasculatura**

Experimentos de ablación del AER han demostrado la influencia de este epitelio en el crecimiento de la vena marginal de la extremidad. Si la operación se realizaba antes de la aparición de la rama anterior y posterior de la vena marginal, éstas no se llegaban a formar; mientras que si la retirada del AER se hacía en un estadio posterior a la aparición de estos dos ramales en la parte proximal de la extremidad, la vena marginal se truncaba y no crecía hacia la parte distal (Wilson, 1983).

**Fig. 15**



**Fig. 15\_Desarrollo de la vasculatura en la extremidad (A) y experimentos de Feinberg et al., 1983 (B).**

**A:** Esquema del desarrollo del plexo vascular de la extremidad en distintos estadios del embrión de pollo.

**B:** Un trozo de ectodermo crea una zona avascular en el plexo vascular (imagen de la izquierda), mientras que la ablación del mismo provoca la progresión de los vasos hacia la periferia de la extremidad (imagen de la derecha).

### Mecanismos moleculares implicados en el patrón vascular de la extremidad.

El crecimiento de la vasculatura en la extremidad sigue un patrón estereotipado necesario para el crecimiento y morfogénesis de esta estructura.

La inducción de extremidades ectópicas en el flanco del embrión reproduce el mismo patrón de vasos, lo cual sugiere que el patrón vascular viene dirigido por señales locales, independientes de la posición antero-posterior. No obstante, los mecanismos moleculares implicados en este proceso son desconocidos y algunos de ellos se han descubierto muy recientemente. Existen varios genes cuya expresión sugiere una relación con la formación de los vasos en la extremidad. Entre ellos se han descrito dos genes de la familia de los factores de crecimiento vascular, *Vegf-D* y *Rigf* en el embrión de pollo. Ambos parecen estar regulados por RA y SHH y su expresión se restringe al mesénquima posterior con un borde anterior que coincide con la posición de la arteria subclavia. Sin embargo, no se ha podido demostrar su papel en la posición de esta arteria (Davey et al., 2007).

A pesar de no haberse encontrado una relación funcional entre estos factores de crecimiento vascular con la vasculatura, sí se ha visto que SHH, molécula que regula su expresión, es esencial en la regulación de genes capaces de inducir la formación de la vena subclavia en la posición adecuada. Mutantes *Talpid*<sup>3</sup> en pollo tienen defectos en la señalización de SHH y como consecuencia no se activa su efector transcripcional, Gli3; la desaparición de la forma represora de este factor de transcripción provoca la expresión ectópica de muchas dianas transcripcionales de SHH en el mesénquima anterior de la extremidad. La inducción de factores pro-angiogénicos de la familia de los VEGFs como VEGF-D y RIGF y de identidad arterial como la Angiopietina2 (Ang2) en el mesénquima anterior, provoca la aparición de múltiples arterias subclavas a lo largo del eje antero-posterior que expresan genes de identidad arterial como la *Neuropilina1* (*Nrp1*) y la *EfrinB2* (*EphB2*) (Davey et al., 2007).

El VEGF-A es uno de los miembros más potentes de la familia de los factores de crecimiento vascular y tiene un papel esencial en la formación, remodelación y supervivencia de la vasculatura del embrión (Ferrara et al., 1996; Carmeliet and Collen, 1999). Al contrario que *VEGF-D* y *RIGF* que tienen una expresión más restringida, este factor parece afectar a toda la vasculatura de la extremidad, ya que la sobreexpresión de su isoforma soluble provoca la aparición de vasos con menos ramificaciones y de mayor calibre, mientras que la sobreexpresión de la isoforma con dominios de unión a heparina en detrimento de las demás isoformas, tiene como consecuencia la formación de vasos con numerosas ramificaciones (Ruhrberg, 2003).

### Interconexión de la vasculatura con otros tejidos de la extremidad

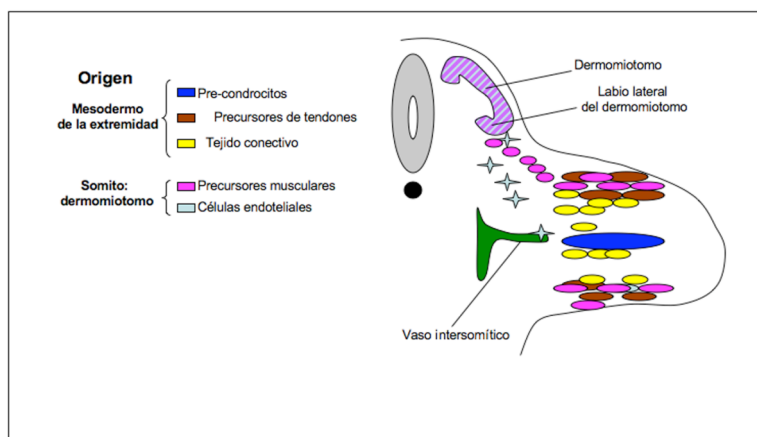
Una vez comienzan a formarse las condensaciones pre-condrogénicas, el sistema vascular sufre grandes cambios. Por un lado se produce una regresión vascular en la zona de las condensaciones; por otro lado ocurren importantes transformaciones morfogénicas en los vasos que rodean a estas condensaciones, generándose una vasculatura más densa y ramificada.

Recientemente se ha demostrado que el *VEGF* se expresa en las condensaciones cartilaginosas desde que aparecen hasta que se inicia la condrogénesis y su expresión parece estar, al menos parcialmente, controlada por el factor de transcripción Sox9. La sobreexpresión de *VEGF* en las condensaciones aumenta la complejidad y densidad de los vasos que las rodean y los vasos que se dirigen a la región de los metacarpales son de mayor calibre. Experimentos de pérdida de función de este factor en el mesénquima de la extremidad, provocaban el efecto contrario: vasculatura con menos ramificaciones, una mayor dispersión de los capilares sin acumulaciones en los espacios interdigitales, y vasos de menor calibre alrededor de las condensaciones.

Tanto los experimentos de ganancia de función como los de pérdida de función, no revelaban ningún cambio en las regiones avasculares de las condensaciones, además de que el bloqueo de los receptores del VEGF, Nrp1, Nrp2, Flt1 y Flk1 en las condensaciones no tenía ningún efecto sobre ellas ni sobre la vasculatura. Por tanto, el VEGF lleva a cabo una señalización a larga distancia sobre las células endoteliales de los vasos que rodean a los elementos esqueléticos (Eshkar-Oren et al., 2009).

Al igual que las condensaciones pueden influir en la morfogénesis de la vasculatura, ésta es esencial en el refinamiento de otros tejidos. Un trabajo interesante de Samuel Tozer y colaboradores muestra como los vasos marcan las zonas de segregación de las masas musculares y, a través de la acción del PDGF- $\beta$ , promueven la formación de tejido conectivo rico en colágeno tipo1 en esas regiones y la inhibición de la diferenciación muscular (Tozer et al., 2007).

**Fig. 16**



**Fig. 16\_Origen de los distintos tejidos de la extremidad**



## **2. 7. 6. El tejido conectivo**

El tejido conectivo está compuesto por células y matriz extracelular (ECM) que secretan esas células, y que las separa unas de otras; la proporción células/ECM varía dependiendo del tejido conectivo. Las células pueden ser fibroblastos u otro tipo de células más especializadas como condrocitos en el caso del cartílago, osteoblastos en el caso del hueso ó tenocitos en el caso de los tendones. En la extremidad, los únicos tejidos que no entran dentro de la definición de tejido conectivo son los nervios y el músculo, ambos procedentes de células que migran dentro de la extremidad. Por el contrario, el tejido conectivo de la extremidad (cartílago, tendones, hueso y el resto del tejido conectivo localizado entre estos tejidos) procede de la somatopleura, a excepción de los osteoblastos que son transportados por los vasos sanguíneos. El proceso de formación del patrón del sistema musculoesquelético se ha centrado principalmente en el esqueleto y el músculo, no obstante, se conoce muy poco sobre las señales que dirigen la morfogénesis y ordenación de músculos y tendones así cómo sus interconexiones con los elementos óseos. Desde 1982, cuando Chevallier concluyó que los precursores musculares de los somitos son iguales en el eje rostro-caudal y que las señales que influyen en su localización y diferenciación en los distintos tipos de músculos dentro de la extremidad vienen del tejido conectivo de esta estructura, se han descrito otros artículos que lo confirman. En un trabajo posterior, Grim and Wachtler demostraron que el tejido conectivo no sólo no depende del músculo, sino que es capaz de inducir la formación de miotubos a su alrededor (Grim et al., 1991). No obstante, las bases moleculares de esta interacción han sido desconocidas hasta la publicación de un trabajo de Kardon y colaboradores en el que se describe como, el gen que codifica el factor de transcripción *Tcf4*, efector de la vía de Wnt, se expresa desde bastante temprano en el tejido conectivo que rodea al músculo y es esencial para la diferenciación de los miotubos en los sitios correctos dentro de la extremidad (Kardon et al., 2003). Así mismo, recientemente se ha publicado un artículo en el que dos factores de transcripción esenciales en la inducción de la extremidad, *Tbx4* y *Tbx5*, son importantes en estadios más tardíos en la morfogénesis de los tendones y los músculos mediante la regulación de varias proteínas del tejido conectivo (Hasson et al., 2010) (ver arriba, en el capítulo de formación de patrón del músculo).

Por tanto, el tejido conectivo que rodea a huesos, músculos y tendones, es una fuente de señalización muy importante en estadios tardíos cuando se forman los tendones y músculos individuales y se establecen las conexiones entre ellos y los elementos esqueléticos.

### **2. 7. 6. 1 Las quimioquinas como posibles reguladores del patrón músculo-esquelético**

Existen muchas moléculas con patrones de expresión muy dinámicos en el tejido conectivo de la extremidad para las que no se ha descrito función.

En esta tesis se caracteriza que dos quimioquinas, el *SDF1/CXCL12* y la *CXCL14* se expresan en distintas regiones del tejido conectivo de la extremidad en estadios tardíos (30-31HH) en el embrión de pollo y alrededor de E13,5 en el embrión de ratón. La primera se encuentra en el tejido conectivo que rodea a las condensaciones cartilaginosas y a los músculos, y la segunda rodea a los blastemas de los tendones en el autopodio. Ambas se expresan en el tejido conectivo que rodea a algunos vasos sanguíneos de la extremidad (ver resultados de esta tesis y Garcia-Andrés C and Torres M, 2010, artículo adjuntado al final de la tesis). La función de *SDF1* y *CXCL14* en estos estadios es desconocida

aunque su expresión indica que probablemente estén moldeando de alguna manera el patrón musculoesquelético en la extremidad.

### Introducción a las quimioquinas

Las quimioquinas son proteínas básicas de bajo peso molecular clásicamente relacionadas con el tráfico leucocitario en las respuestas inflamatorias del Sistema Inmune. Estas proteínas se pueden clasificar en cuatro grupos según el número de aminoácidos que tengan entre sus dos cisteínas conservadas: CCL, CXCL, XCL y CX3CL, y todas ellas se unen a receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCRs), que, a su vez, mandan señales intracelulares capaces de modular la movilidad, adhesión, proliferación y supervivencia celular (Mellado et al., 2006).

Estudios funcionales en ratón, pollo y pez cebra, han demostrado que algunas quimioquinas pueden promover la migración de distintos tipos celulares fuera del sistema inmune. El ejemplo mejor caracterizado es el del SDF1. Este se une a dos receptores el CXCR4 y el CXCR7 con distinta afinidad (Balabanian et al., 2005) y en distintos contextos. Los ratones que carecen tanto de SDF1 como de su receptor CXCR4, tienen defectos en linfopoyesis y mielopoyesis (Nagasawa et al., 1996; Zou et al., 1998); reclutamiento de las células madre en la médula ósea, formación del septo ventricular, migración neuronal en el hipocampo y el cerebelo (Klein et al., 2001; Bagri et al., 2002; Lazarini et al., 2003); formación de la vasculatura intestinal (Tachibana et al., 1998); migración de las células germinales (Doitsidou et al., 2002; Molyneaux et al., 2003; Stebler et al., 2004; Boldajipour et al., 2008); migración de los precursores musculares en la extremidad (vasyutina et al., 2005). Este último trabajo es especialmente relevante, ya que el SDF1 es la única quimioquina que se expresa en la extremidad; éste se detecta en el mesénquima central de la extremidad a estadios tempranos y ejerce una atracción sobre los precursores musculares que expresan CXCR4 y se sitúan en el mesénquima subectodérmico dorsal y ventral. Esta interacción entre ligando y receptor promueve el posicionamiento y supervivencia de estos precursores (vasyutina et al., 2005).

En coherencia con su implicación en procesos altamente conservados en los distintos organismos, SDF1 es la quimioquina más conservada, junto con CXCL14, otra quimioquina de la familia CXC mucho menos estudiada que la primera y de la que no se conoce cual es su función en embriogénesis. Ambas quimioquinas tienen muy baja homología con otros miembros de la familia, lo que resulta bastante poco común en un grupo de proteínas tan redundante.

### CXCL14

Además de su alta conservación evolutiva, CXCL14 tiene unas características estructurales únicas que no se encuentran en ningún otro miembro de la familia: el extremo amino terminal que precede a las dos cisteínas conservadas es especialmente corto y posee cinco aminoácidos extra después del aminoácido en la posición 63 (Hromas et al., 1999).

CXCL14 se expresa en condiciones homeostáticas en tejidos epiteliales; En humano y en ratón los tejidos donde se detecta mayor expresión son la piel (queratinocitos de la epidermis y fibroblastos de la dermis), el intestino y el riñón (Kurth et al., 2001; Meuter and Moser, 2008).

Varios trabajos con células humanas han demostrado el papel de la CXCL14 como quimioatrayente selectivo de una población de monocitos sanguíneos CD14+ que pueden dar células dendríticas y macrófagos (Kurth et al., 2001; Schaerli et al., 2005), e incluso se ha especulado sobre su posible función como promotor de estas células dendríticas inmaduras a la piel y así facilitar indirectamente su diferenciación en células de Langerhans (Schaerli et al., 2005). Sin embargo, a pesar de la gran homología de la quimioquina de ratón con la humana, los ratones deficientes en el gen que codifica para la CXCL14, son viables y fértiles, y no presentan ninguna anomalía en ninguna población celular del

Sistema Inmune (Meuter et al., 2007). No obstante, estudios metabólicos realizados recientemente en estos mutantes describen una resistencia a la obesidad inducida por una dieta rica en grasas (Nara et al., 2007). En experimentos con células endoteliales humanas se ha visto que esta quimioquina es capaz de contrarrestar la acción pro-angiogénica de otras moléculas como el bFGF y el VEGFR tanto “in vitro” como en ensayos de angiogénesis en córnea de rata; no obstante, el mecanismo por el cual CXCL14 lleva a cabo esta inhibición es desconocido ya que no se ha descubierto el receptor al que se une en estas células (Shellenberger et al., 2004). Su función anti-angiogénica correlaciona con la baja expresión de esta proteína en la mayoría de las líneas tumorales y en algunos tumores, lo cual la convierte en un potencial factor supresor de tumores (Izukur et al.; Ozawa et al., 2009b).



# **Objetivos**



# Objetivos

**Objetivo general:** Aislamiento y caracterización de nuevos genes implicados en la formación del patrón de la extremidad con especial atención a su eje proximodistal

- Caracterización del patrón de expresión de esos genes mediante hibridación in situ.
- Realización de un estudio más detallado del patrón de expresión de los genes candidatos y un estudio funcional de los mismos.

## Objetivos específicos derivados del primero:

- Estudio del patrón de expresión de la quimioquina CXCL14 durante la embriogénesis, con especial atención al análisis de su expresión en la extremidad de vertebrados (pollo y ratón en este caso).
- Estudio de la función de CXCL14 en el desarrollo de la extremidad de vertebrados.
- Estudio del patrón de expresión del factor de transcripción Prdm16.
- Análisis funcional del ratón mutante *Prdm16* <sup>-/-</sup>





**Materiales**

**y**

**Métodos**



## **Materiales y métodos**

### **Plásmidos utilizados en transfecciones y electroporaciones**

La secuencia codificante del gen *CXCL14* de pollo fue clonada con una secuencia Kozak consenso en los sitios *Spe1* (5') y *Xho1* (3') en el plásmido de expresión de eucariotas *PCX-IG*, con un promotor *CMV*, el enhancer de la  $\beta$ -actina de pollo, y un *IRES-GFP* a continuación del sitio de clonaje del gen. Debido a la ineficiencia de la expresión de la GFP utilizando este vector en la electroporación del pollo, subclonamos el gen *CXCL14* en el plásmido *PCAGS* de expresión en eucariotas, también con un promotor *CMV* y el enhancer de la  $\beta$ -actina de pollo; para ello sacamos el gen del *PCX-IGFP* cortando con *Sac1* (5') y *Xho1* (3') y lo clonamos en estos mismos sitios de restricción en el *PCAGS*.

La secuencia del receptor *CXCR7* se clonó en el plásmido *pCMV-Tag3B* que permite fusionar al N-terminal de la proteína una cola de aminoácidos de cMyc para su inmunodetección. El clonaje se realizó con *BamH1* en el 5' y *HindIII* en el 3'.

### **Ribosondas**

Las sondas utilizadas fueron transcritas según protocolos estándar de transcripción "in vitro" usando los siguientes reactivos: : 4X RNA polymerase transcription buffer (Promega), (promega), RNA Dig labelling Mix (Roche), DTT (promega), RNasin Plus RNase inhibitor (Promega), Sp6, T3 or T7 RNA polymerase (Promega).

Se sintetizaron dos sondas de *CXCL14* a partir cDNA de ratón de E10,5, una de un fragmento de la 3'UTR y otra cubriendo la mayor parte de la secuencia codificante. La síntesis se realiza a partir del producto de PCR, fusionado en el extremo 3' a la secuencia del promotor de la RNA polimerasa Sp6.

Se diseñaron dos sondas de la *CXCL14* de pollo, una correspondiente a la 3'UTR y otra de la secuencia codificante y parte de la 3'UTR.

Las sondas de scleraxis de ratón y de pollo fueron amablemente facilitadas por Cliff Tabin (Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA). La sonda de *Pax3* fue amablemente facilitada por Martín Goulding (Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92037, USA). La sonda de *Sox9* de ratón fue generosamente proporcionada por James Sharpe (Center for Genomic Regulation, Barcelona, Spain). La sonda de *Sox9* de pollo se sintetizó a partir de la EST603372442F1 procedente de "ARK Genomics". La sonda del *SDF1* de ratón abarca parte de la secuencia codificante y parte de la 3'UTR, mientras que la sonda de *SDF1* se sintetizó a partir de un fragmento de la 3'UTR.

La sonda de *MyoD* fue obtenida de la base de datos de pollo de Manchester. Las sondas de *Col1a1* y *Col2a1* fueron amablemente facilitadas por Marian Ros (Profesora de Investigación CSIC del IBBTEC, Universidad de Cantabria).

### **PCRs**

#### ***Genotipado de los ratones *Prdm16*<sup>GT</sup>***

La banda KO se amplificó utilizando un oligo que anilla dentro de una de la LTR situada en el 5' de la construcción del *genetrap* y otro en la secuencia endógena del gen aguas arriba de la inserción dentro del locus del *Prdm16*. La banda Wt se genera a partir de dos oligos que anillan a ambos lados de la inserción. Los oligos son los siguientes:

U7-WT: CCA ACG GAA GGC ACA GAT AC  
L7-WT: GGA AGC AAC CAC CAC AGG AC

U1-KO: CTG GGC TGT TAG TGG TCT CTC A  
L1-KO: CTT GTG GTC TCG CTG TTC CTT G

### *Amplificación del cDNA para las sondas del proyecto de genómica*

La mayor parte de los fragmentos de cDNA para hacer las ribosondas del proyecto del proyecto de genómica se amplificaron con el siguiente programa:

94°C 3'

94°C 30" }  
60°C 30" } 2 veces  
72°C 2' }

94°C 30" }  
58°C 30" } 1 vez  
72°C 2' }

94°C 30" }  
56°C 30" } 2 veces  
72°C 2' }

94°C 30" }  
54°C 30" } 1 vez  
72°C 2' }

94°C 30" }  
52°C 30" } 34 veces  
72°C 2' }

72°C 5 / 4°C hasta que se saque la PCR.

### Hibridación in situ en embriones enteros

Los embriones de ratón y de pollo se recogen a distintos estadios y fijados en 4% PFA en PBS a 4°C toda la noche. Al día siguiente se deshidratan pasándolos por concentraciones crecientes de metanol/PBT hasta metanol 100% (Una vez en metanol se pueden guardar a -20°C).

El protocolo de hibridación in situ es el estandar y está descrito en publicaciones anteriores (Wilkinson and Nieto, 1993), excepto por algunas especificaciones que relatamos a continuación.

#### *Tiempos de proteinasa K utilizados:*

##### **Ratón**

E9,5: 5-6 minutos a 10 µg/ml

E10,5: 10 minutos a 10 µg/ml

E11,5: 12 minutos a 10 µg/ml

E12,5: 15 minutos a 10 µg/ml

E13,5: 18 minutos a 50 µg/ml

\*Sondas de marcadores de la clavícula

##### *Sox9 y Col2a1*

E12,75: 30 minutos a 10 µg/ml

E13: 30 minutos a 50 µg/ml

E13,5: 30 minutos a 60 µg/ml

##### *Col1a1*

E12,75: 30 minutos a 40 µg/ml

E13: 30 minutos a 50 µg/ml

E13,5: 30 minutos a 60 µg/ml

(\*para la tinción de la clavícula ponemos gran cantidad de proteinasa k y cortamos la cabeza a los embriones para favorecer la penetración de la sonda, ya que esta estructura no es fácil de detectar)

##### **Pollo**

\*Sonda *CXCL14* (expresión ectodérmica):

17HH: 6 minutos a 20 µg/ml

22HH: 12 minutos a 20 µg/ml

26HH: 20 minutos a 20 µg/ml

Sondas mesenquimales:

##### *Scleraxis*

22-23HH: 25 minutos a 30 µg/ml

24-25HH: 30 minutos a 30 µg/ml

*Pax3*

22-23HH: 20 minutos a 20 µg/ml

24-25HH: 30 minutos a 20 µg/ml

*Cdh5*

22-23HH: 20 minutos a 20 µg/ml tmp<sup>a</sup> de hibridación: 55°C

24-25HH: 30 minutos a 20 µg/ml tmp<sup>a</sup> de hibridación: 60°C

\*(las sondas de genes con expresión ectodérmica llevan mucha menos proteinasa K ya que esta puede digerir el ectodermo; las sondas de genes de mesénquima pueden estar tiempos largos con la proteinasa K, sin que esto afecte negativamente al resultado)

### Hibridación in situ en secciones de parafina

Este protocolo ha sido realizado según está descrito en una publicación anterior (Mallo et al, 2000).

### Experimento de Microarrays

Se recolectaron células de la zona de progreso (zona distal indiferenciada del esbozo de la extremidad) de 15 *limbs* anteriores en estadio de 20 somitos, de 8 *limbs* en estadio de 30 somitos, y de otros 8 *limbs* de estadio de 40 somitos, para hacer extracción de RNA; Este experimento se hizo por triplicado (3 muestras de RNA de cada estadio). El servicio de genómica del Centro Nacional de Biotecnología extrajo el RNA y lo hibridó con chips de affimetrix de ratón de 39.000 transcritos. En el análisis de resultados, se consideró como genes que aumentaban la expresión aquellos cuyo *fold change* estaba por encima de 2, y genes que disminuían su expresión aquellos en los que el control tenía un *fold change* por encima de 2.

### Medición de Ca<sup>2+</sup> intracelular

1. Se transfectó una placa p100 de células 293 con el vector *pCMVtg3B-CXCR7* (ver detalles del vector más arriba) y otra con el vector vacío como control, usando el protocolo estándar de transfección con el *kit* del Jetpai y 10 µg de cada plásmido.

A las 24h se levantan las células con EDTA (evitando la tripsina para no dañar los receptores de membrana) y se mide el nivel de expresión del receptor en membrana en el citómetro de flujo mediante el protocolo de *Staining*.

2. *FACS Staining* (protocolo estandar; ver Mellado et al., 2001): se utilizó una dilución 1/500 del anticuerpo α-tag de cMyc (9E10:sc-40; Santa Cruz Biotechnology)

3. Detección de Ca<sup>2+</sup> intracelular: Protocolo estandar con Fluo3 (ver Mellado et al., 2001).

## Migración de células L1.2

Se electroporaron células de la línea pre-B de ratón (a 1170  $\mu$ F) con el *CXCR7* clonado en el plásmido *pCMVtag3B* (con una cola de aminoácidos de cMyc) y con el plásmido vacío como control; a las 24 horas de la electroporación se siembran 250.000/100 $\mu$ l células en unos cestillos con un poro de 3  $\mu$ m de diámetro colocados encima de placas multipocillo (de 12 pocillos cada una), que contienen medio sin suero con la concentración correspondiente de quimioquina. Se dejan las placas en un incubador de cultivo celular 4h ,y, posteriormente, se cuentan las células que han caído del cestillo al pocillo con medio en el citómetro de flujo.

## Experimento con bolas de affigel

### *Preparación de las bolas:*

Se ponen de 5-10  $\mu$ l de PBS con bolas de affigel en una placa petri pequeña de plástico normal (que no esté tratado para células adherentes). A continuación se echa sobre la gota con bolas el mismo volumen de PBS fresco para lavar bien las bolas. Una vez lavadas mediante un pipeteo suave, se quita la mayor parte del PBS con una pipeta de 2  $\mu$ l y el resto se retira por capilaridad con unas pinzas de disección. En otra placa petri se hace una cámara húmeda poniendo varias gotas de unos 5  $\mu$ l por todo su perímetro dejando libre el centro de la placa, donde pipeteamos 1  $\mu$ l de CXCL14 recombinante de ratón de la casa comercial *R&D systems* a una concentración de 1,25  $\mu$ g/ $\mu$ l (nº catálogo: 730-XC); justo encima de esa gota echamos 1  $\mu$ l de PBS y lo mezclamos con una pipeta, de manera que CXCL14 queda una concentración final de 0,6  $\mu$ g/ $\mu$ l. Las bolas de la otra placa anterior a las que se les ha extraído el líquido se cogen acercando la punta de una pinza de disección llevándolas a la placa donde hemos preparado la cámara húmeda (al acercar la pinza se quedan pegadas a ella) y se echan sobre la gota que contiene la proteína. Para las bolas control con PBS se sigue el mismo procedimiento, pero en el último paso poniendo una gota de PBS sin proteína. Las bolas se dejan cargándose con la proteína durante 1 hora a temperatura ambiente antes de implantarlas en los embriones.

### *Implantación de las bolas en la extremidad*

Primeramente, se retira la membrana transparente que recubre la extremidad con unas pinzas y hace una herida pequeña con una aguja de tungsteno en el seno del mesénquima de la extremidad anterior de un embrión pollo de 20-21HH.

Una vez las bolas están cargadas, se separa una de ellas en la placa con una pinza de disección y se pincha con una aguja de tungsteno. Se espera unos segundos para que la bola se seque un poco pero no del todo, ya que así mengua un poco de tamaño, y luego se introduce en la herida y se mantiene dentro unos instantes hasta que se rehidrate; esto último es importante para que la bola se hinche y se haga más grande que la herida de forma que es más difícil que se salga. Haciendo tope con una pinza en la superficie de la extremidad se saca la aguja del tejido sin la bola.

Después de 6 y 24 horas de incubación, se recogen los embriones y se fijan en PFA 4%.

### Electroporación del mesénquima de la extremidad

Mezcla de electroporación: 1,5 µg/µl de plásmido (*pCAGS-CXCL14* ó *pCAGS* en el caso de los controles), *pCAGS-GFP* en una proporción 1/12 con el plásmido experimental, 0,01% fase green y PBS.

Con un capilar conectado a un microinyector se aspira una pequeña cantidad de la mezcla de electroporación y se inyecta en la cavidad celómica del flanco en la zona prospectiva de la extremidad anterior de un embrión de pollo de 15HH. Se coloca el electrodo negativo debajo del embrión y el electrodo positivo encima, de manera que se electropora el mesodermo lateral justo encima de la cavidad celómica.

Una vez colocados los electrodos, se le aplican 3 pulsos de 10V, con un intervalo de 10 ms y una longitud de pulso de 50 ms.

### Electroporación de morfolinos en el ectodermo

Morfolino de bloqueo de la traducción: TGCTGTCAGGAGCTTCATGGCGAG; la secuencia diana del mRNA es la siguiente: CTCGCC(ATG)AAGCTCCTGACAGCA.

Morfolino de bloqueo de *splicing*: bloquea el aceptor de splicing entre el primer intrón y el segundo exón ; secuencia del morfolino: CTCCTGGAAGAGAAAGCATTGCTC. Secuencia diana del mRNA de CXCL14 de pollo: GAGCAAATGCTTTCTTCCAGGAG. Ambos morfolinos están unidos a fluoresceína para posibilitar su detección.

La electroporación se realizó 11H en el flanco del embrión de pollo. Se hicieron diluciones de 1/10 y 1/5 del morfolino , se echan de 0,5 a 1 µl en el flanco derecho y posicionando el electrodo negativo en la parte dorsal del embrión y el positivo en la ventral, se dieron 5 pulsos de 50ms de longitud, con un espacio entre pulsos de 450ms y un voltaje de 10V. Los resultados se analizaron a las 48h de la electroporación.

### Inmunohistoquímica de MF20

Se realizan secciones de 7 µm de patas de E13,5 de ratón embebidas en parafina y secan a 37C° toda la noche. Al día siguiente las secciones se lavan varias veces con Xilol para retirar la parafina y a continuación se rehidratan pasándolas por varias soluciones de concentraciones decrecientes de etanol hasta H<sub>2</sub>O. Posteriormente se les da un lavado de PBS y se fijan con 4% PFA 15 minutos. Después de la fijación, se hace un lavado de PBS de 5 minutos y se bloquea la peroxidasa endógena con una solución de 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Después de varios lavados de H<sub>2</sub>O, las secciones se incuban toda la noche con una dilución 1/20 del anticuerpo monoclonal que reconoce la sarcómera de la miosina (MF20; Hybridoma Bank) en PBS con 10% de suero de cabra. Después de varios lavados de PBS, las secciones se incuban durante toda la noche con una dilución 1/500 de un anticuerpo secundario de ratón biotinilado en PBS. Seguidamente se lava el secundario varias veces en PBS y se echa sobre los cortes la solución con el complejo Avidita Biotina ("ABC kit") y se deja durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se lavan los portados dos veces de 5 minutos con H<sub>2</sub>O y se inicia el revelado de la señal añadiendo la solución de Diaminobencidina (DAB). A los 10 minutos se miran los portados a la lupa y si la señal es suficientemente intensa se para el revelado con H<sub>2</sub>O.



## Inyección de tinta

Se prepara una solución con 2 partes de tinta china y una parte de PBS en un eppendorf. Se sonica la mezcla durante 30 minutos a potencia máxima; el sonicador se pone en modo continuo, sin ciclos.

Se aspira un poco de esta solución con un capilar terminado en punta unido a un microinyector, rompiendo un poquito la punta al apoyarla suavemente contra el tubo. Si la punta se rompe demasiado no es apropiado porque no es fácil pinchar los vasos del embrión. Si no se logra mellar sutilmente la punta es mejor no romperla.

Se saca el huevo con el embrión del incubador justo antes de realizar el experimento para que la circulación vaya suficientemente acelerada y la perfusión de tinta sea instantánea y llegue rápido al corazón que la distribuirá al resto del embrión. Se pincha una de las venas vitelinas con la punta del capilar y se va expulsando la tinta con la ayuda del microinyector. Una vez el plexo vascular del esbozo de las extremidades está bien teñido, se recoge el embrión en una placa con PBS, se le quitan las membranas y se fija en Ácido Tricloracético (TCA) al 5% en H<sub>2</sub>O. Los embriones se dejan fijando toda la noche sin agitación a 4°C. Al día siguiente, se lavan con H<sub>2</sub>O para quitar los restos de TCA y se deshidratan con concentraciones crecientes de etanol en H<sub>2</sub>O; la secuencia de deshidratación consiste en 30 minutos en etanol 70% en agitación, 30 minutos en etanol 90% en agitación, y 2 veces de 30 minutos en etanol 100%. Seguidamente, los embriones se clarean introduciéndolos en Metil-Salicilato, donde se pueden fotografiar.

En el caso de los experimentos con bolas, los embriones se sacan del incubador pasado el tiempo estipulado (en nuestro caso 6 y 24 horas) y se procede a la inyección de tinta siguiendo todos los pasos arriba mencionados.

En el caso de los experimentos de electroporación en el mesénquima de la extremidad, los embriones se sacan del incubador concluido el tiempo requerido, se les hace una foto en la lupa de fluorescencia para ver los niveles de electroporación y posteriormente se procede con el protocolo de inyección de tinta.

## Secciones de parafina de los embriones inyectados con tinta

Los embriones fijados en TCA 5% se lavan varias veces con H<sub>2</sub>O y se deshidratan pasándolos por etanol 70%, etanol 90% y 100% como se ha descrito en el apartado anterior. Una vez en etanol 100% los embriones se pasan a Xilol y se continúa el protocolo como una hibridación in situ en secciones estandar (Mallo et al, 2000).

Si ya se tienen los embriones en Metil-Salicilato, se realizan los mismos pasos pero a la inversa; del Metil-Salicilato se pasan a etanol 100% (un par de lavados de 30 minutos cada uno), y posteriormente se introducen en Xilol y se siguen los pasos normales de la hibridación in situ en secciones.

## Tomografía de proyección óptica (OPT) de los embriones inyectados con tinta

Con el fin de visualizar con detalle la cercanía de los vasos mesénquimales a la bola cargada con CXCL14 recombinante, realizamos secciones utilizando la técnica del OPT. Para ello seguimos el siguiente procedimiento:

Se seccionan los embriones fijados en TCA 5%, quedándonos únicamente con las extremidades anteriores unidas al tronco. Éstas se lavan con H<sub>2</sub>O para limpiar el TCA y se incluyen en un pocillo de una placa petri de 6 pocillos al que previamente se le ha echado agarosa de bajo punto de fusión (*Low melting*) al 1% en H<sub>2</sub>O. El embrión se lava primeramente un poco en agarosa en un pocillo que reservaremos como “pocillo de lavado”. Cuando la agarosa está

templada (alrededor de 30°C), se embebe el embrión en el pocillo definitivo y se va colocando el embrión de manera que el eje de éste quede paralelo a la base de la placa y en el centro del bloque de agarosa. Se mete la placa a 4°C y se deja unos 30 minutos (hasta que solidifique la agarosa). Una vez solidificada la agarosa, se talla un cuadrado alrededor de la muestra con una cuchilla de cortar bandas de geles de manera que los bordes queden bastante alejados del embrión y se vuelca la agarosa en una superficie plana (por ejemplo en la tapa de la placa de 6 pocillos). Con la cuchilla se tallan las 6 caras del bloque de forma que queden rectas y planas, cuidando de dejar una buena capa de agarosa entre la muestra y cada cara; es importante que, la distancia del embrión a la base del bloque, la cual va ir en contacto con el cilindro metálico que se acopla a la máquina del OPT, sea por lo menos de medio centímetro. En este paso nos podemos ayudar de una plantilla de líneas ortogonales. Posteriormente se pega la base del bloque al cilindro metálico cuyo eje define el eje de giro de la máquina; por ello, es importante definir cual va ser el eje de giro del embrión antes de pegarlo. Una vez el bloque está fijado en el cilindro, podemos generar nuevas caras con la cuchilla hasta que quede un bloque octogonal, con aspecto ligeramente piramidal (caras planas pero ligeramente oblicuas). Después de realizar todos estos pasos, el bloque se introduce en un matraz con metanol 100% durante toda la noche para su deshidratación. Al día siguiente, se hace un cambio de metanol para completar la deshidratación y a continuación se mete el bloque en un matraz con BABB (1 parte de Bencil Alcohol + 2 partes de Bencil Benzoato) para clarear la muestra durante toda la noche. Una vez hecho esto, el bloque ya se puede meter en la máquina de OPT.

#### Medida del tamaño de las extremidades electroporadas en el mesénquima e inyectadas con tinta.

Únicamente se midió el eje proximo-distal, trazando una línea recta desde la mitad del eje antero-posterior al punto más distal de la extremidad y anotando la medida en cm (esto se hizo en el power point). Posteriormente, se hizo la relación entre el tamaño de la extremidad electroporada y la extremidad control y se representó gráficamente.

#### Tinción LacZ de los embriones de la línea *Prdm16GT (Prdm16 Gene trap)*

Una vez extraídos, se lavan los embriones en PBS durante 10 minutos. Posteriormente, se fijan en glutaraldehído al 0,125% en PBS durante 15 minutos en el caso de los estadios tempranos (E8,5-9,5) y 30 minutos en el caso de estadios tardíos (E11,5-12,5). Seguidamente se hacen dos lavados de PBS de 10 minutos cada uno, alargándolos un poco en el caso de los embriones más grandes. El siguiente paso es un lavado de 10 minutos en el tampón LacZ (12,98 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3,74 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 ml MgCl<sub>2</sub> 1M, 1,1 gr deoxicualato sodico, 1,1 gr deoxicualato sodico, 20 ml Tris HCl 1M pH=7,3; enrasar a 1l de agua; ajustar pH a 7,3). A continuación, después de retirar el tampón anterior, se echa el tampón de revelado que lleva un 0,1% (V/V) de Ferrocianuro Potásico 5 mM, un 0,1% de Ferrocianato Potásico 5 mM, 20 µg/ml de Xgal y tampón LacZ, dejándose los embriones en esta solución en oscuridad y en agitación varias horas hasta que se vea una buena señal.

#### Tinción esquelética con azul Alcian y rojo Alizarin

Tras extraer los embriones, se fijan en etanol 95% y se dejan agitando toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se sustituye el etanol por la solución de Azul Alcian que tiñe cartílago (Stock 10X: 80ml ETOH 98%, 20ml Ac. Acético glacial, 0,15g de Azul Alcian 8GX), en la que se dejan en agitación un mínimo de 24h, aunque pueden estar

varios días en esta solución. Posteriormente, se realizan dos ó tres lavados de etanol 95% de 1 hora cada uno. Los siguientes pasos del protocolo varían en función del estadio:

**Neonatos y embriones no más tempranos de E14,5:**

Después del lavado de azul Alcian se procede a la digestión de los tejidos blandos con KOH 2% durante 4 horas sin agitación y con vigilancia periódica del proceso para evitar la sobre-digestión. Cuando los embriones estén bastante clareados, se introducen en solución de rojo Alizarin en 2% de KOH (para 10ml: 5ml KOH 2%, 1ml Rojo Alizarin 10X (0,05% en agua), 4ml de agua), y se dejan revelando sin agitación y en oscuridad durante un tiempo aproximado de 4 horas. Si no nos da tiempo a concluir las 4 horas, la tinción se puede parar con agua y seguir la tinción al día siguiente. Una vez finalizada la tinción, se embeben en glicerol 20%/KOH 2% para aclararlos y acabarlos de digerir durante alrededor de 1 hora para luego pasarlos a Glicerol 50%/Etanol donde se pueden dejar largo tiempo. En los de 14,5, si están suficientemente digeridos, se meten directamente en glicerol 20% sin KOH 1 hora y luego se dejan en Glicerol 50%/Etanol.

**E13-13,5:**

Se digieren con KOH 0,5% un máximo de 1 hora; Posteriormente, se tiñen con rojo alizarin en KOH 0,5% y se dejan sin agitación unas 4 horas (puede ser menos, en cuanto estén bien teñidos se puede parar. Cuando los embriones están bien teñidos, se introducen en Glicerol 20% 1 hora y luego en Glicerol 50%/ Etanol, donde se pueden almacenar durante un tiempo.

**E12,75:** Se digieren con KOH 0,25% de unos 20 minutos y luego se tiñen con rojo alizarin en KOH 0,25% durante unas 4 horas.

Estos estadios no tienen tejidos duros, por lo que es muy fácil que el embrión se sobre-digiera; Por tanto, es recomendable vigilar periódicamente la digestión. Tras la tinción, los embriones se introducen en Glicerol 20% 1 hora y luego en Glicerol 50%/ Etanol, donde se pueden almacenar durante un tiempo.



# **Resultados**



## **1. Aislamiento de nuevos genes implicados en el desarrollo de la extremidad de vertebrados:**

Este proyecto de tesis se enmarca dentro de un proyecto de aproximación genómica dirigido específicamente a aislar y caracterizar funcionalmente genes implicados en el desarrollo de las extremidades persiguiendo los siguientes objetivos:

### **Objetivos:**

- 1.- Identificación de nuevos genes implicados en el desarrollo de la extremidad de vertebrados y caracterización de su patrón de expresión en el embrión de ratón.
- 2.- Caracterización de la función y regulación de los genes seleccionados en el objetivo 1.

Para llevar a cabo estos dos objetivos se han diseñado dos abordajes experimentales distintos:

- Búsqueda de genes homólogos a genes de *Drosophila* que estén implicados en el desarrollo de las extremidades de la mosca, y que estén conservados en vertebrados.
- Experimento de Microarrays dirigido a identificar genes implicados en el patrón proximo-distal de la extremidad.

En este trabajo nos hemos centrado principalmente en el Segundo abordaje; no obstante, describiremos el primero brevemente, pues también ha proporcionado datos interesantes.

### **1. 1. Aislamiento de genes de vertebrados homólogos a genes del ala de *Drosophila***

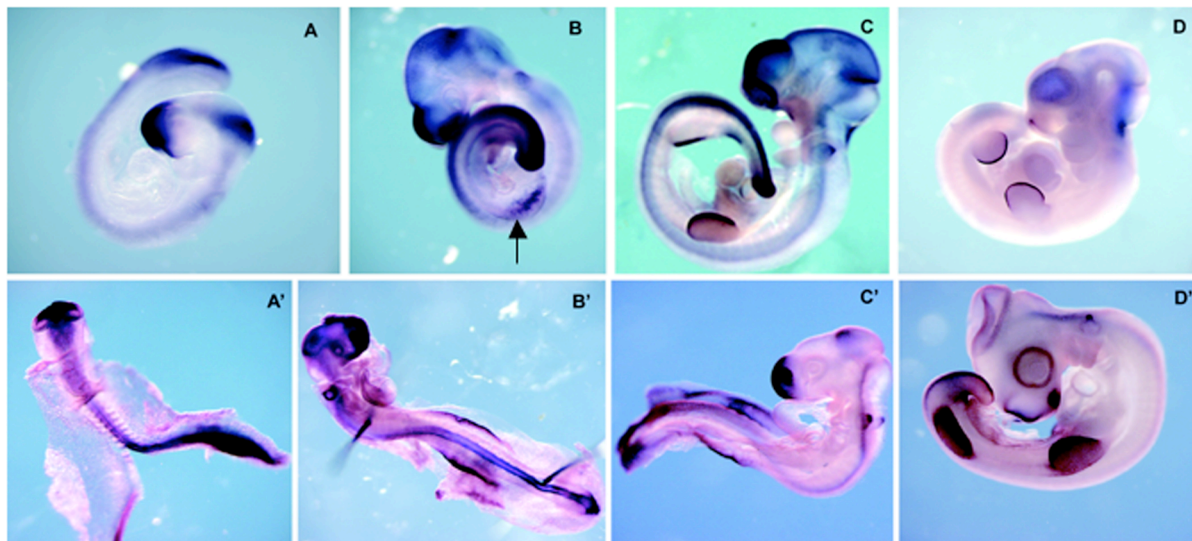
Como primera aproximación en este abordaje, se hizo una búsqueda exhaustiva en las bases de datos del genoma del ratón tanto públicas como privadas con el fin de encontrar genes homólogos a genes de *Drosophila* que estuvieran implicados en el desarrollo de los apéndices de la mosca.

Tras realizar experimentos de hibridación in situ en embriones de ratón de E10,5 de los candidatos seleccionados, encontramos un patrón especialmente interesante correspondiente al gen *Sp8*, homólogo del gen *Gap* de *Drosophila* *Button-Head* (*Btd*). *Sp8* tenía una marcada expresión en el AER, un epitelio pseudestratificado localizado en la interfase dorso-ventral de la extremidad, que constituye uno de los centros de señalización más importantes para el crecimiento proximo-distal de ésta. Por esta razón, decidimos ampliar el estudio del patrón de expresión de *Sp8* a otros estadios tanto en el embrión de ratón (**Fig. 17A-D**) como en el embrión de pollo (**Fig. 17A'-D'**). El gen *Sp8* es un factor de transcripción tipo dedo de zinc C2H2 de la familia de los *Krupple like factors* y a la subfamilia de proteínas *Sp*, que se definen así por tener una *Sp box* el dominio N-terminal; A su vez, esta subfamilia contiene en el C-terminal una secuencia aminoacídica llamada *Btd box* (*Button Head box*) que debe su nombre a la proteína *Button head* de *Drosophila* (Bouwman and Philipsen, 2002)..

La función clásica del gen *Button Head* es la especificación de los segmentos de la cabeza de la mosca; Sin embargo, recientemente se ha descubierto que su papel fundamental en la especificación temprana de los apéndices ventrales de *Drosophila* (Estella and Mann, 2010). Basándonos en la especificidad del patrón de

expresión y los paralelismos con el ortólogo de *Drosophila*, nos dispusimos a estudiar la función de *Sp8* en la extremidad de vertebrados.

**Fig. 17**



**Fig. 17\_** **A:** Patrón de expresión de *Sp8* en estadio 9 dpc donde está muy marcada la expresión en telencéfalo , mesencéfalo, tubo neural y cola. **B:** Embrión de 9.5 dpc en el que destaca la expresión de *Sp8* en los precursores del AER (flecha), en el ectodermo ventral del *limb-bud*. **C:** Embrión de 10.5 dpc en el que *Sp8* se expresa en el AER, en las placodas olfatorias, telencéfalo, en el istmo, vesícula ótica y tubo neural. **D:** A estadio 11.5 dpc, *Sp8* se sigue viendo fuertemente expresado en el AER; además la expresión permanece en las placodas olfatorias , telencéfalo y parte más caudal del tubo neural . **A':** E12 somitos de un embrión de pollo; *Sp8* se expresa en todo el encéfalo: prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo, así como en el tubo neural. **B':** Embrión de estadio HH15 (Hamilton Hamburger) donde se ve expresión de *Sp8* en el mesodermo lateral donde va a emerger la extremidad anterior; también se ve expresión en el telencéfalo , tubo neural y en el *tail bud* (extremo más caudal del tubo neural). **C':** Embrión de estadio HH17; Se ve expresión de *Sp8* en el ectodermo del flanco donde se está empezando a inducir el primordio de la extremidad; Este dominio de expresión forma un borde definido con los somitos en los que no hay expresión. **D':** Embrión de estadio HH22 en el que se observa expresión de *Sp8* en el AER y en el ectodermo del *limb-bud*; Al igual que en ratón se expresa en placodas olfatorias , vesícula ótica y cola.

Tras comenzar la caracterización de este gen a nivel funcional, otro grupo demostró su implicación en la inducción de la extremidad de vertebrados, situándolo en la jerarquía genética por encima del gen *FGF8*, factor de crecimiento esencial en el desarrollo proximo-distal de esta estructura (Treichel et al., 2003; Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004)

*Con esta caracterización del gen sp8, descriptiva por parte de nuestro grupo, y funcional realizada por otros grupos de investigación, se demuestra que, además de la homología de secuencia de muchos genes de Drosophila con genes de vertebrados, en muchos casos también puede existir una homología funcional.*

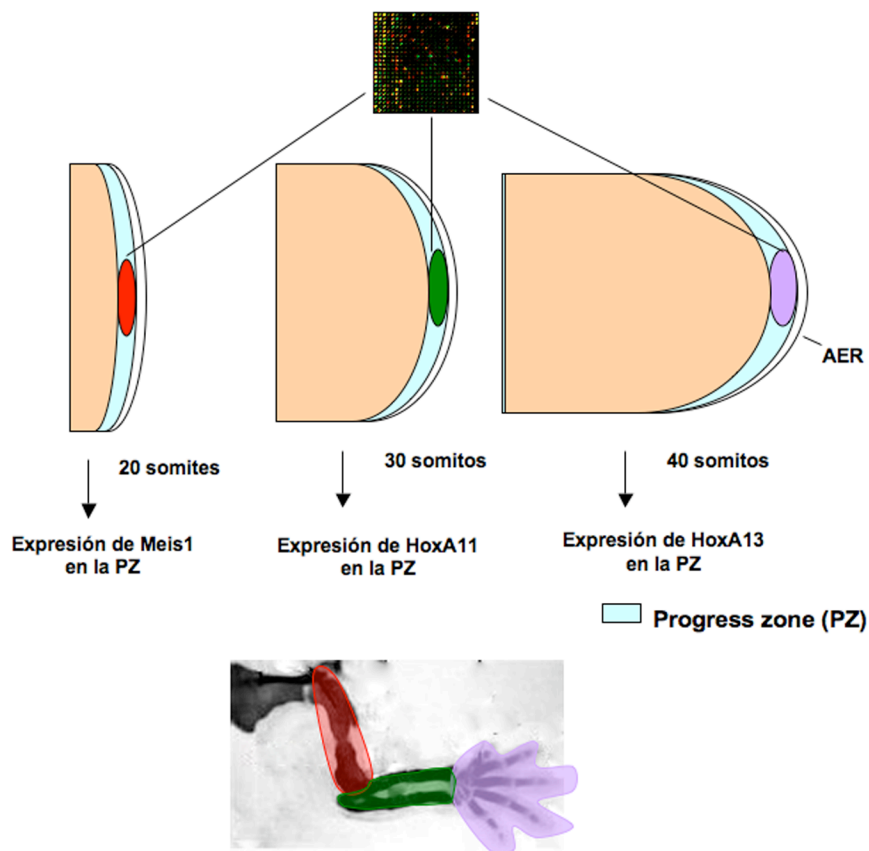


## 1. 2. Aislamiento de genes implicados en el patrón proximo-distal de la extremidad de vertebrados mediante microarrays.

Para realizar este experimento, se recolectaron células del mesénquima distal indiferenciado del primordio de la extremidad anterior en tres estadios embrionarios distintos: 20 somitos (9-9,5dpc), 30 somitos (10.5 dpc) y 40 somitos (11dpc), correspondiendo con la expresión de los genes de identidad *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13*; De este modo, se pretendía encontrar genes implicados en la especificación proximo-distal de la extremidad. La razón por la cual se evitaron zonas más proximales a la zona de progreso era que, a pesar de que allí también puedan estar operando genes de patrón, queríamos excluir genes de diferenciación.

Se hizo RNA de las células recolectadas y éste se hibridó con los chips de affimetrix; cada experimento de hibridación se hizo por triplicado. Cogiendo la media entre los valores absolutos de cada experimento, hicimos una gráfica que representaba el perfil de expresión de cada gen a lo largo de los tres estadios elegidos (Esquema en **Fig. 18**).

**Fig. 18**

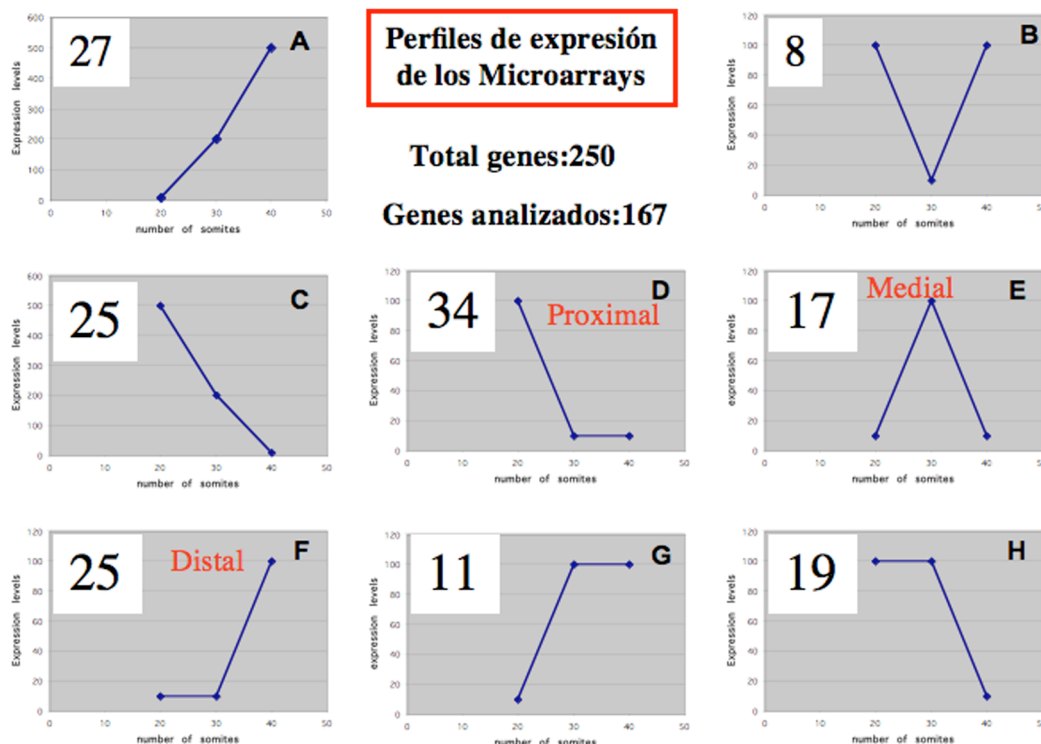


**Fig. 18\_Esquema del experimento de Microarrays.**

Se cogen células de la zona de progreso (región en azul claro) a 20, 30 y 40 somitos, estadios en los cuales se expresan los genes de patrón *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13*, respectivamente y se hibridan con chips de affimetrix.

Después de procesar los datos de los Microarrays por criterios estadísticamente restrictivos (*fold change* mayor de 2), se obtuvo un cupo de alrededor de 250 genes, de los cuales se eligieron 167 con un *fold change* mayor de 2 entre dos estadios consecutivos, con el fin de seleccionar aquellos con mayores variaciones de expresión de un estadio a otro; Todos estos genes se agruparon, atendiendo al valor positivo ó negativo del crecimiento de la señal en cada intervalo de desarrollo (20-30s/30s-40s) en 8 categorías: Incremento/Incremento (I/I; 27 genes), Disminución/Disminución (D/D; 25 genes), Mantenimiento/Incremento (M/I; 25), Disminución/Incremento (D/I; 8 genes), Incremento/Disminución (I/D; 17 genes), Mantenimiento/Disminución (M/D; 19 genes), Disminución/Mantenimiento (D/M; 34 genes), Incremento/Mantenimiento (I/M; 11 genes). Un gen prototípico implicado en la especificación de los elementos más proximales de la extremidad se expresará muy fuerte a 20 somitos como pasa con *Meis1* en la zona de progreso, y su expresión irá decayendo en los siguientes estadios, mientras que un gen de especificación de elementos mediales se expresará más intensamente a 30 somitos en la zona de progreso como lo hace *Hoxa11*, y su expresión será más baja a 20 y 40 somitos; Así mismo, un gen de especificación distal, tendrá su punto máximo de expresión a 40 somitos y su expresión será menor en los estadios anteriores, como le ocurre a *Hoxa13* (ver tipos de perfiles de expresión en Fig. 19).

**Fig. 19**

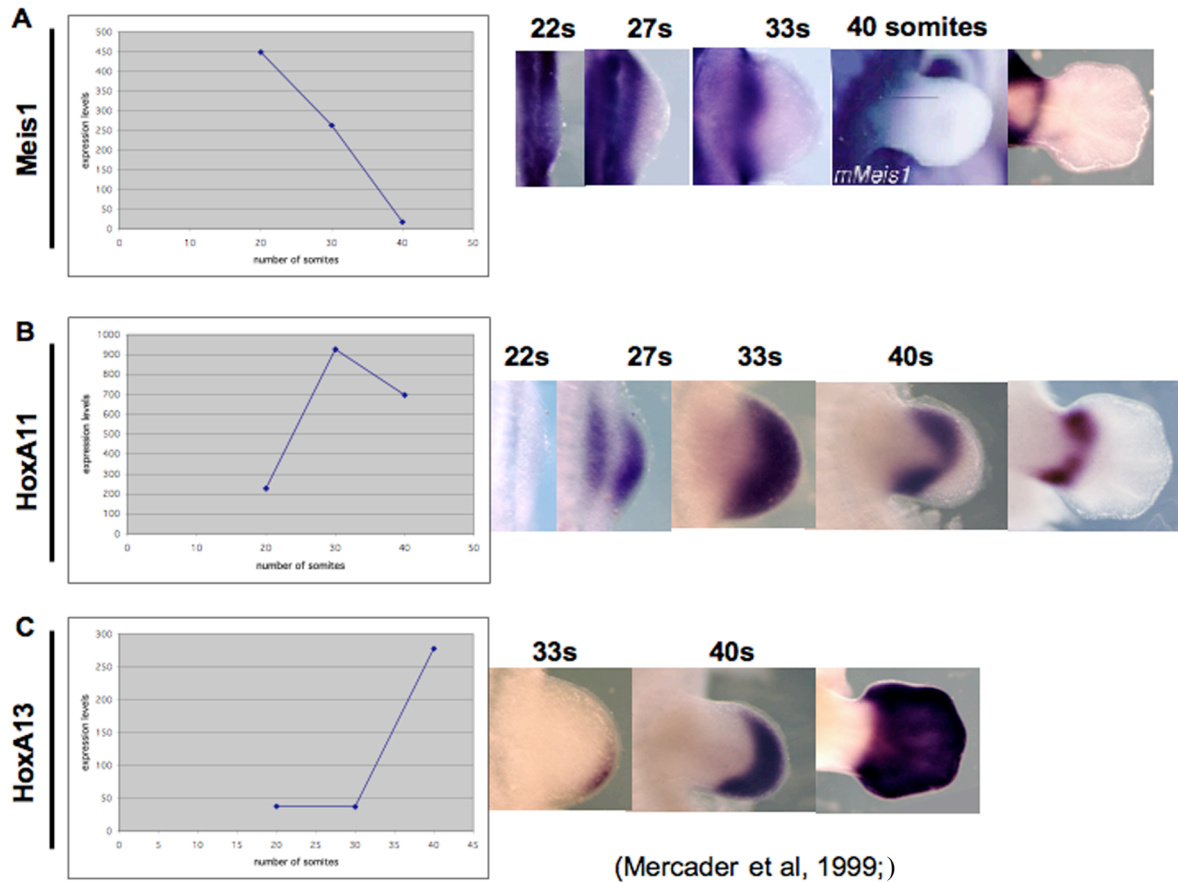


**Fig. 19\_Tipos de perfiles de expresión de los genes analizados en el experimento de microarrays.** En el eje X se representa número de somitos y en el eje Y niveles de expresión.  
D: perfil prototípico de gen proximal. E: perfil prototípico de gen medial. F: perfil prototípico de gen distal.

Con el fin de validar el experimento de Microarrays, se hizo una comparación de los perfiles de expresión de *Meis*, *Hoxa11* y *Hoxa13* obtenidos con los chips de affimetrix, y sus patrones de expresión obtenidos por Hibridación In Situ en embriones de distintos estadios.

Como se puede ver en la **Fig. 20**, el resultado fue que la dinámica de expresión de estos tres genes en la extremidad coincidía comparando ambas aproximaciones, lo cual nos sirvió como control positivo para demostrar que el experimento estaba bien diseñado y correctamente realizado.

**Fig. 20**



**Fig. 4\_ Validación del experimento de microarrays mediante la comparación de los perfiles de expresión con los patrones de expresión realizados por hibridación in situ de los genes *Meis1* (A), *HoxA11* (B) y *HoxA13* (C).**

Los 167 genes seleccionados fueron clasificados en 5 categorías moleculares:

- Proteínas de membrana
- Factores de transcripción con homeodominio
- Factores de transcripción sin homeodominio
- Factores secretados

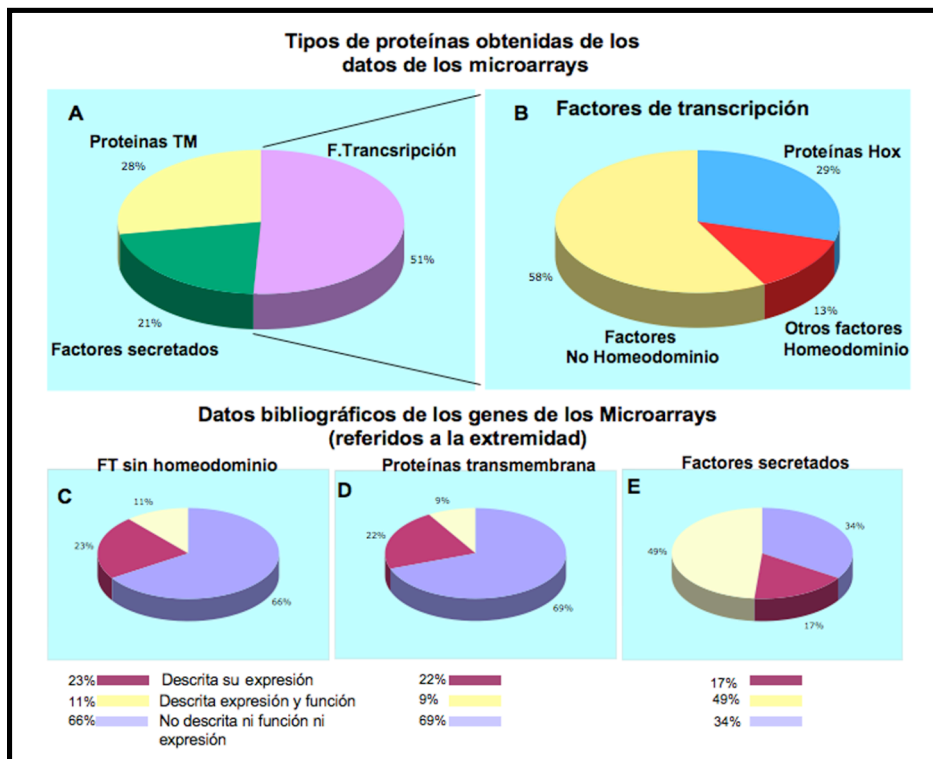
Cómo queda reflejado en el diagrama de sectores de la **Fig. 21A**, se obtuvo un 51% de factores de transcripción (homeodominio y no homeodominio), un 28% de proteínas transmembrana, y un 21% de factores secretados. Dentro del grupo de factores de transcripción, un 58% corresponden a factores de transcripción no homeobox, un 29% son proteínas homeodominio no pertenecientes a la familia de genes *Hox*, y un el 13% son proteínas homeodominio pertenecientes a la familia de genes *Hox*.

Es importante remarcar, que la mayoría de los miembros de la familia de los genes *Hox* resultaron diferencialmente expresados en el experimento de Microarrays; Teniendo en cuenta el patrón de expresión de estos genes en el desarrollo del primordio de la extremidad, podemos concluir que el experimento está bien diseñado ya que los resultados están enriquecidos en genes implicados en formación de patrón.

A pesar que todos los genes *Hox* aislados habían sido previamente estudiados en el contexto de la extremidad de vertebrados, muchos de los patrones de expresión encontrados en la literatura eran consistentes con los perfiles de expresión obtenidos en los Microarrays, y por tanto, constituían un buen control de la calidad del experimento.

De la misma manera realizamos una búsqueda bibliográfica exhaustiva de los genes restantes, con el fin de centrar nuestro estudio en aquellos menos conocidos. El mayor número de genes aún no descritos en la extremidad corresponde a los factores de transcripción sin homeodominio y a las proteínas transmembrana. Este último caso es especialmente interesante ya que se desconocen las proteínas implicadas en la adhesión diferencial de distintas poblaciones celulares. En el caso de los factores secretados, por el contrario, el porcentaje de genes desconocidos en el contexto de la extremidad es mucho menor (**Fig. 21C, D, E**).

**Fig. 21**



**Fig. 21 Diagramas de sectores con los porcentajes de genes obtenidos de los Microarrays**

**A:** Porcentajes de los genes según su categoría molecular

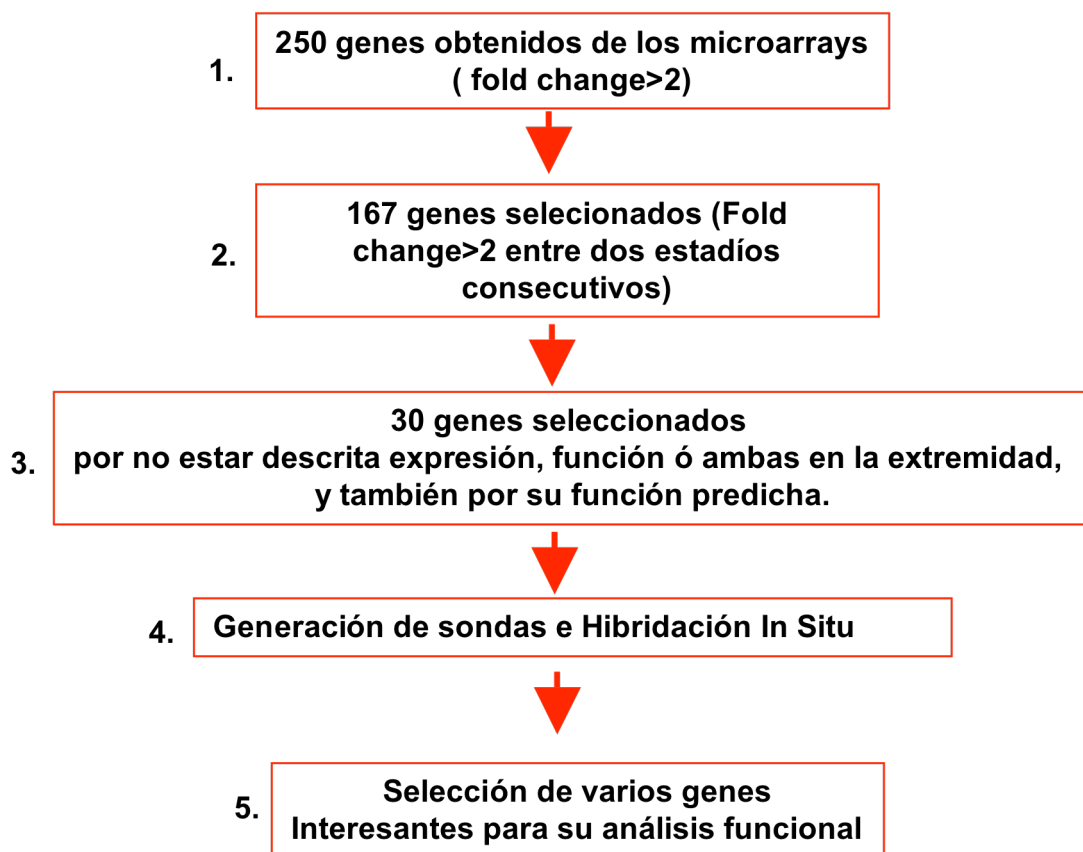
**B:** Porcentajes de los distintos tipos de factores de transcripción

**C-E:** Porcentajes de los genes de acuerdo a los datos bibliográficos

Nota: Estos datos se obtuvieron en el año 2005, y por tanto pueden haber sufrido algunas modificaciones.

El siguiente paso fue realizar experimentos de Hibridación In situ de los 30 genes seleccionados para estudiar la distribución del RNA mensajero en el embrión (ver esquema explicativo en **Fig. 22**), centrando nuestra atención en la extremidad. Esto nos permitió generar una base de datos con patrones de expresión potencialmente interesantes para un consiguiente estudio más profundo de su regulación y función. En este trabajo, muestro los patrones de expresión más interesantes, agrupados según sus perfiles de expresión en los microarrays. La mayoría de estos perfiles siguen una dinámica parecida a la señal del RNA en el embrión, aunque existe cierta desviación entre las dos aproximaciones en los casos en los que no coinciden totalmente los estadíos de la in situ con los estadíos escogidos para los microarrays (**Fig. 24-29**)

**Fig. 22**



**Fig. 22\_ Esquema de de los pasos seguidos para el procesamiento de los datos obtenidos en el experimento de microarrays**

Fig. 23

### A. Factores de transcripción homeobox

20-30	30-40	Affimetrix	20	30	40	Gen	Cromosoma
I	I	1452400_a_a	A 22	P 207	P 538	HoxA11 opposite strand	chr6:52,716,766-
I	I	1450584_at	A 43	meis1	P 480	HoxD11	chr2:75,076,729-
I	M	1431475_a_a	P 117	P 1034	P 1311	HoxA10	chr6:52,701,974-
I	M	1418606_at	P 322	P 1927	P 1638	HoxD10	chr2:75,086,306-
I	M	1424233_at	A 19	P 112	P 122	Meox2=mesenchyme	chr12:31,797,839-
I	M	1418317_at	P 316	P 928	P 550	Lhx2=LIM homeobox protein 2	chr2:38,623,918-
I		1420559_a_a	A 4	P 118	A 9	Shox2	chr3:68,548,322-
I	D	1420414_at	P 227	P 926	P 697	HoxA11	chr6:52,712,882-
I	D	1455626_at	P 1527	P 3760	P 2611	HoxA9	chr6:52,694,830-
M	I	1450553_at	A 10	A 39	P 401	HoxD12	chr2:75,069,423-
M	I	1440626_at/	A 33/A	P 250/A	P2012/P	HoxD13	chr2:75,062,646-
M	I	1422336_at	A 38	A 37	P 278	HoxA13	chr6:52,729,629-
M	D	1419126_at	P 1599	P 2033	P 425	HoxD9	chr2:75,092,099-
M	D	1450209_at	P 443	P 467	P 161	HoxD4	chr2:75,121,410-
M	D	1431099_at	P 841	P 853	P 305	HoxD8	chr2:75,100,128-
M	D	1421193_a_a	P 383	P 406	P 207	Pbx3	chr2:34,444,726-
D	M	1420565_at	P 670	A 44	A 36	HoxA1	chr6:52,626,156-
D	M	1450832_at	P 221	A 24	A 4	HoxC5	chr15:105,111,501-
D	M	1418415_at	P 304	A 34	A 8,3	HoxB5	chr11:95,887,320-
D	M	1451776_s_a	PA 205	A 35	A 21	Hod	chr5_random:41,988,685-
D	M	1453501_at	P 199	A 31	A 36	HoxB1	chr11:95,949,371-
D	M	1424797_a_a	P 281	A 38	A 12	Pitx2	chr3:132,826,461-
D	M	1441070_at	P 147	A 59	A 49	Hoxa3 antisense?	chr6:52,643,671-
D	M	1448926_at	P 1178	P 493	P 497	HoxA5	chr6:52,672,530-
D	D	1417129_a_a	P 952	P 472	A 97	Meis2	chr2:116,132,979-
D	D	1452412_at	P 388	P 210	P 106	HoxC8	chr15:105,088,576-
D	D	1421072_at	P 280	P 147	AP 44	Irx5	chr8:93,558,639-
D	D	1450992_a_a	P 449	P 263	A 18	Meis1	chr11:18,783,291-
D	D	1459790_x_a	P 295	P 121	P 56	Alx3	chr3:110,734,153-
D	D	1418517_at	P 825	P 475	A 49	Irx3	chr8:92,978,312-
D	D	1451660_a_a	P 708	MP 129	A 20	HoxB6	chr11:95,882,784-
D	D	1422870_at	P 534	MP 133	A 11	HoxC4	chr15:105,131,882-
D	D	1435022_at	P 174	PA 36	A 11	Cart1 homeobox	chr10:105,533,001-
D	D	1420573_at	P 122	PA 33	A 18	HoxD1 ¿limbs?	chr2:75,157,316-
D	D	1452317_at	P 270	A 56	A 7	HoxB9	chr11:95,855,524-
D	D	1449397_at	P 700	PA 304	A 121	HoxB2	chr11:95,936,414-
D	D	1456229_at	P 530	P 208	A 33	HoxB3, 3'	chr11:95,929,303-

- Incremento/Incremento
- Incremento/Mantenimiento
- Incremento/Disminución
- Mantenimiento/Incremento
- Mantenimiento/Disminución
- Disminución/Mantenimiento
- Disminución/Disminución
- Disminución/Incremento

## B. Factores de transcripción no homeobox

20-30	30-40	Affimatrix	20	30	40	Gen	Cromosoma
I	I	1422195_s_a	A 11	P 296	P 449	TBX14/TBX15	chr3:102,074,761-102,175,149
I	I	1423424_at	MP 27	P 331	P 881	Zic3=zinc finger protein of the cerebellum 3	chrX:47,674,898-47,680,159
I	I	1426552_a_a	A 4	P 59	P 220	Bcl11a =B-cell CLLlymphoma 11A (zinc finger protein)	chr11:23,976,817-23,989,577
I	I	1456140_at	A 43	P 155	P 202	Zic5= zinc finger protein of the cerebellum 5	chr14:115,561,834-115,568,334
I	I	1440870_at	P 67	P 422	P 502	BLIMP-1, Prdm1=PR-domain zinc finger protein 1 (Beta-interferon gene positive- regulatory domain I binding factor) (BLIMP-1).	chr10:46,042,607-46,064,168
I	I	1420619_a_a	A 31	P 129	P 194	AES=GRG protein (ESP1 protein) (Amino enhancer of split) (AES-1/AES-2) (Grq-5)	chr10:83,934,695-83,940,014
I	I	1438245_at	A 53	P 120	P 184	Nfib=nuclear factor I B	chr4:80,902,986-81,112,632
I	I	1422751_at	P 152	P 338	P 425	Tle-1 (Grq-1) Mus musculus transducin-like enhancer of split 1, homolog of Drosophila E(spl) (Tle1)	chr4:70,623,844-70,707,559
I	I	1449530_at	P 263	P 638	P 752	Trps1, Mus musculus trichorhinophalangeal syndrome I, zinc finger	chr15:51,636,116-51,807,629
I	I	1421317_x_a	A 51	P 122	P 195	Myb=myeloblastosis proto-oncogene product	chr10:21,979,123-21,981,780
I	I	1415999_at	A 123	P 262	P 682	Hey1, hairyenhancer-of-split related with YRPW motif 1	chr3:8,736,399-8,740,026
I	M	1443383_at	P 19	P 55	P 51	Muscle-bind zinc finger protein, intron sequence	chrX:42,393,648-42,517,647
I	D	1418478_at	MP 120	P 531	P 324	Lmo1=Lim-only 1	chr7:101,205,235-101,207,373
I	D	1449871_at/A	64/P 88	211/P331	P92/P144	T-box18 (Tbx18)	chr9:90,662,795-90,689,147
I	D	1419324_at	P 886	P 2523	P 1989	lhx9= LIM homeobox protein 9	chr1:141,789,606-141,803,547
I	D	1425528_at	P 924	P 1995	P 1121	Prx1=paired related homeobox 1	chr1:166,802,028-166,812,345
I	D	1437667_a_a	P 264	P 519	P 278	Bach2=BTB and CNC homology 2. Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor	chr4:32,678,432-32,696,383
I	D	1429308_at	A 19	P 78	MP 52	Prdm16. PR-DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 16, zinc finger transcription factor MEL1	chr4:152,433,723-152,448,565
I	D	1441579_at	MP 23	P 52	A 15	Dmrta1=Doublesex and mab-3 related transcription factor 4.	chr4:88,435,548-88,436,193
I	D	1433939_at	P 194	P 292	AP 120	lymphoid nuclear protein related to AF4	chr1:38,871,016-38,878,535
M	I	1423340_at	A 35	A 44	P 425	Tcfap2b: transcription factor AP-2 beta	chr1:19,354,501-19,380,267
M	I	1416301_a_a	A 1	A 8	P 49	Ebf, HLH transcription factor	chr11:44,243,260-44,630,674
M	I	1456341_a_a	A 10	A 23	P 126	Klf9=Kruppel-like factor 9	chr19:23,287,475-23,311,677
M	I	1450489_at	A 29	A 38	P 212	Sal3 (Sall1)	chr8:89,930,555-89,944,757
M	I	1430463_a_a	A 17	A 11	P 126	Sncal, synphilin, ankyrin repeats, synuclein alpha-interacting protein	chr18:53,142,001-53,281,387
M	I	1419304_at	A 40	A 39	P 162	T, brachyury	chr17:8,089,070-8,097,144
M	I	1436853_a_a	P 56	PA 40	P 96	Snca =synuclein, alpha	chr6:61,291,373-61,418,308
M	D	1418157_at	P 427	P 310	A 43	Nr2f1=nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	chr13:76,260,218-76,269,537
M	D	1435385_at	P 180	P 200	A 26	Steroid hormone receptor	chr2:170,501,552-170,502,245
M	D	1442025_a_a	P 83	P 107	A 39	Teashirt 2 intron	chr9:50,615,460-50,731,259
M	D	1417356_at	P 1620	P 1729	P 634	PLZF alternative splicing at 3'	Peg 3 = Mus musculus paternally expressed 3 , Zinc finger transcription factor downstream of p53 in apoptosis induction by bax
M	D	1437479_x_a	P 136	P 110	A 41	Tbx3	chr7:6,504,703-6,528,435
M	D	1418932_at	P 116	P 141	A 26	Nfil3 = Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor	chr5:118,696,708-118,697,151
M	D	1422537_a_a	P 784	P 618	P 269	Interleukin 3 regulated	chr13:52,734,808-52,748,482
D	I	1431225_at	P 505	P 312	P 863	Idb2= ID-2, HLH, non-basic, transcription inhibition	chr12:19,542,043-19,544,311
D	I	1450853_at	P 372	P 247	P 642	3' os sox11?, HMG-box transcription factor	chr12:21,780,601-21,786,171
D	I	1449031_at	P 181	A 52	P 122	Bce1=B lymphocyte gene=groucho-related 4 (grg-4). Tle 4	chr19:14,222,414-14,223,887
D	I	1417409_at	P 150	MA 70	P 112	msg1: melanocyte-specific gene 1. CITED proteins do not bind DNA directly and are thought to function as transcriptional co-activators.	chrX:92,152,042-92,156,373
D	M	1450126_at	P 105	A 10	A 7	Jun	chr4:94,098,039-94,099,700
D	M	1425464_at	P 269	A 65	A 60	Gata5	chr2:180,136,351-180,145,892
D	M	1438861_at	P 147	A 36	A 44	Gata6	chr18:11,267,927-11,299,196
D	M	1421773_at	P 234	A 106	A 107	Weakly similar to BASO_MOUSE ZINC FINGER PROTEIN BASONUCLIN (M.musculus) ZF, TF?	chr4:82,945,152-83,330,951
D	M	1421141_a_a	P 100	P 40	P 50	Etsrp71: Mus musculus ets related protein 71	chr7:24,599,733-24,601,967
D	M	1451046_at	P 185	PA 84	PA 83	Foxp1	chr6:100,585,305-100,818,512
D	D	1421515_at	P 179	P 65	A 37	FOG1, zinc finger protein	chr8:124,128,059-124,183,166
D	D	1424942_a_a	P 471	P 164	MP 67	Nr6a1:nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1 . Orphan nuclear receptor, RAR like	chr2:39,030,682-39,230,189
D	D	1440108_at	P 57	P 27	A 14	myc	chr15:63,244,051-63,323,342
D	D	1447886_at	P 1218	P 283	A 35	Foxp2	chr6:14,995,604-15,236,880
						transcrito a caballo de Hoxb6 y hoxb5	chr11:95,875,205-95,894,554



## C. Proteínas transmembrana

20-30	30-40	Affimetrix	20	30	40	Gen	Cromosoma
I	I	1418778_at	A 17	P 169	P 343	PUTATIVE TM, RIKEN cDNA 9030408N13	chr3:133,531,055-133,534,737
I	I	1448162_at	P 116	P 403	P 754	Vcam1= vascular cell adhesion molecule 1	chr3:119,447,629-119,466,914
I	I	1450757_at	P 598	P 2049	2812	Cdh11= Mus musculus cadherin 11	chr8:104,168,942-104,321,062
I	I	1429021_at	P 57	P 151	P 362	EphA4	chr1:79,106,774-79,247,981
I	I	1455607_at	PA 28	P 67	P 161	Thsd2= thrombospondin, type I, domain 2	chr10:30,344,333-30,425,886
I	M	1417143_at	P 305	P 523	P 707	Edg2=endothelial differentiation, lysophosphatidicacid G-protein-coupled receptor, 2	chr4:58,187,784-58,305,713
I	M	1422869_at	PA 74	P 302	P 328	c-mer proto-oncogene (Mer). Tyrosine kinase receptor	chr2:128,950,457-129,053,649
I	M	1458229_at	A 7	P 50	P 61	Robo2 alternative splicing? Fibronectin and Ig domain cell adhesion receptor	chr16:75,500,256-75,500,799
I	M	1433571_at	P 19	P 45	P 49	expressed sequence C86123 electron transport, integral to membrane	chr13:90,946,222-90,946,990
I	M	1434423_at	P 79	P 179	P 182	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1, engulfment, signal transduction, apoptosis	chr1:45,775,203-45,881,150
I	D	1423608_at	P 502	P 1692	P 390	Itm2a =integral membrane protein 2A	chrX:97,325,467-97,331,396
I	D	1437360_at	A 36	P 87	MA 44	Weakly similar to T31066 vascular cadherin-2 - mouse (M.musculus) New cadherin	chrX:122,078,427-122,079,076
I	D	1419638_at	P 250	P 340	P 257	EphrinB2	chr8:8,674,255-8,714,411
I	D	1437231_at	A 14	PM 25	A 3	Slitrk6 = Neuronal transmembrane protein	chr14:103,572,576-103,579,063
I	D	1434112_at	P 598	P 968	P 418	Calcium-independent alpha-latrotoxin receptor 2 precursor. G protein-coupled, seven transmembrane receptor	chr3:152,720,112-152,746,271
M	I	1421106_at	A 53	A 80	P 439	Jag1=jagged 1	chr2:137,223,916-137,227,112
M	I	1424254_at	P 256	P 187	P 932	interferon induced transmembrane protein 1. RIKEN 1110036C17	chr7:133,119,497-133,122,090
M	I	1449893_a_at	A 18	A 43	P 131	Img: integral membrane glycoprotein	chr6:96,160,684-96,256,298
M	I	1452031_at	A 54	A 48	P 108	glutamate transporter	chr15:9,001,074-9,001,380
M	I	1420784_at	A 42	A 43	P 105	sodium channel, voltage-gated, type XI, alphapolypeptide	chr9:122,129,637-122,199,313
M	I	1448510_at	A 48	A 65	P 167	ephrin A1	chr3:91,515,038-91,522,944
M	I	1416529_at	P 239	P 232	P 520	Epithelial membrane protein-1 (EMP-1) (Tumor-associated membrane protein)	chr6:136,772,942-136,793,067
M	I	1421297_a_at	A 59	A 51	P 107	Cacna1c= calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	chr6:120,256,073-120,773,545
M	I	1435349_at	P 145	P 228	P 560	Nrp2: neuropilina 2, receptor transmembrana . VASCULAR ENDOTHELIAL CELL GROWTH FACTOR 165 RECEPTOR 2	chr1:64,407,841-64,408,375
M	I	1454824_s_at	AP 30	P 39	P 98	mitochondrial tumor suppressor gene 1	chr8:40,680,544-40,773,108
M	D	1439498_at	P 924	P 1500	P 289	Punc, putative neuronal cell adhesion molecule	chr9:67,533,919-67,581,613
M	D	1456326_at	P 1280	P 1994	P 708	Putative Proteina fosfatasa transmembrana con dominios Fibronectina tipo III.	chrX:96,329,192-96,347,605
M	D	1434957_at	P 245	P 288	P 123	Cdon: cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes. Cell adhesion protein with Fibronectin type III and IG repeats	chr9:36,159,189-36,211,463
M	D	1433795_at	P 205	PA 194	A 99	TGFbeta receptor 3 3' UTR?	chr5_random:7,649,619-7,650,192
D	I	1441165_s_at	P 32	A 14	P 87	calsynenin 2. Postsynaptic protein.	chr9:99,838,996-99,839,392
D	I	1454613_at	P 313	PA 149	P 308	Ly6a=lymphocyte antigen 6 complex, locus A	chr15:76,746,214-76,749,225
D	M	1423606_at	P 399	A 17	A 19	Osf2=osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	chr3:55,770,313-55,800,239
D	M	1439036_a_at	PA 37	A 4	A 1	Atp1b1=ATPase, Na+K+ transporting, beta 1 polypeptide	chr1:167,482,076-167,488,322
D	M	1417133_at	P 607	P 117	P 94	Pmp22=peripheral myelin protein, 22 kDa	chr5:109,324,007-109,335,731
D	M	1454881_s_at	P 184	A 45	A 48	Uroplakin 3B precursor	chr5:134,873,118-134,873,564
D	M	1419693_at	P 186	P 78	P 82	Colec12=collectin sub-family member 12	chr18:9,757,514-9,927,843
D	M	1454903_at	P 185	A 66	A 50	Ngfr =nerve growth factor receptor	chr11:95,154,377-95,171,170
D	M	1448688_at	P 418	P 171	P 129	Podxl=podocalyxin	chr6:31,377,092-31,421,661
D	M	1451753_at	P 169	A 71	A 56	Plxn2= plexin 2	chr1:198,620,818-198,789,743
D	M	1438115_a_at	P 552	P 262	P 260	Slc9a3r1=solute carrier family 9 (sodiumhydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	chr11:114,669,017-114,686,794
D	M	1420847_a_at	P 502	P 196	P 162	Fgfr2=fibroblast growth factor receptor 2	chr7:122,402,882-122,419,500
D	D	1449939_s_at	P 2017	P 519	P 110	Dlk1=delta-like 1 homolog	chr12:105,030,012-105,037,140
D	D	1456329_at	P 659	P 255	A 89	Hypothetical fibronectin type III domain containing protein. dominios fibronectina e inmunoglobulina.	chr9:75,333,901-75,443,574
D	D	1454838_s_at	P 1680	P 1034	A 10	putative S/T/Y kinase receptor, gb:BB323985	chr17:83,962,318-83,962,485
D	D	1429313_at	P 206	P 123	A 27	mROR1= Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1 precursor (Neurotrophic tyrosine kinase, receptor-related 1)	chr4:98,950,696-99,322,395
D	D	1426300_at	P 165	PA 92	A 61	ALCAM=activated leukocyte cell adhesion moleculeCD166	chr16:52,616,352-52,868,368



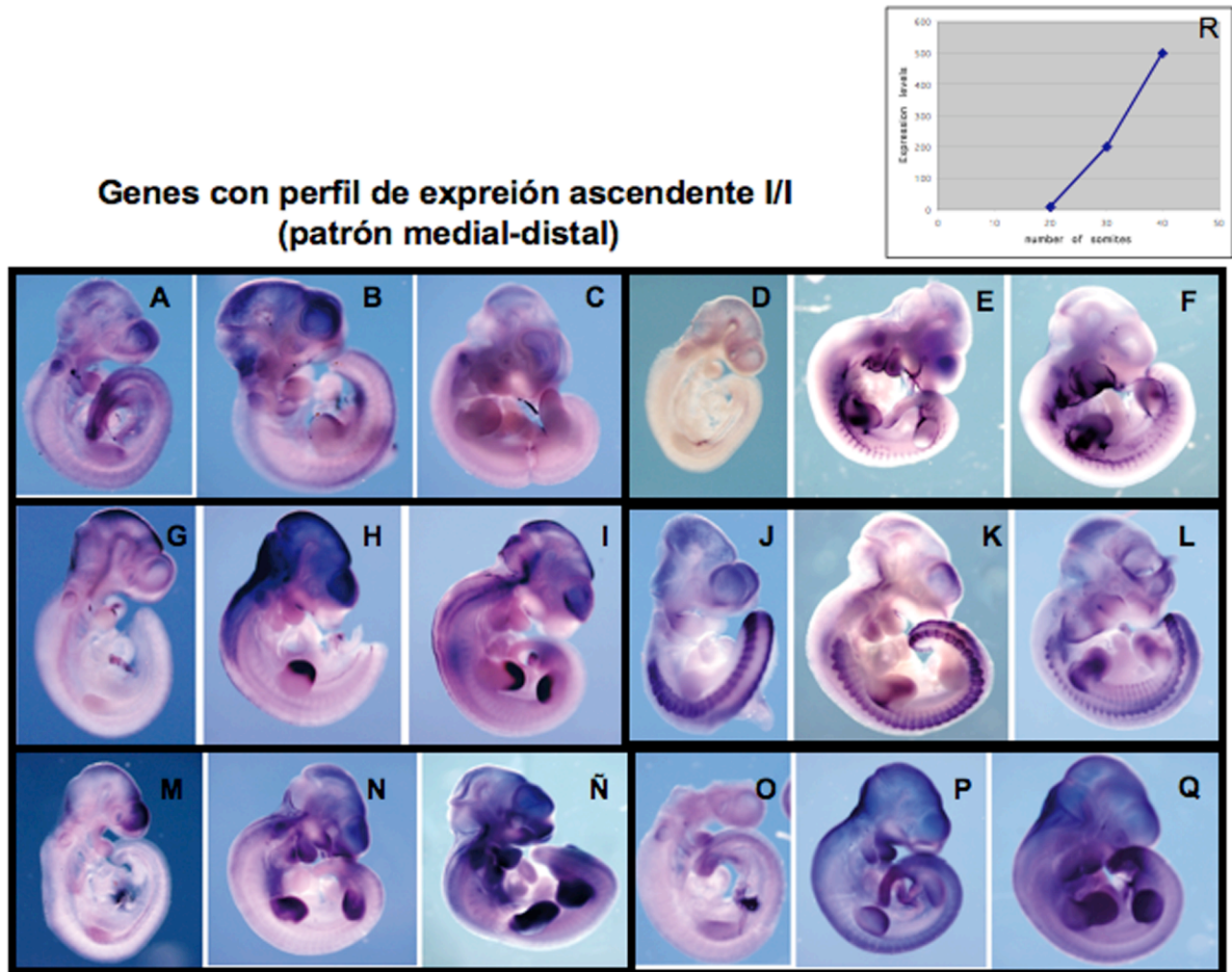
## D. Factores secretados

20-30	30-40	Affimetrix	20	30	40	Gen	Cromosoma
I	I	1416658_at	P 204	P 637	P 1287	Frzb= Fritz	chr2:80,774,259-80,809,686
I	I	1455961_at	A 23	P 79	P 101	Kap =kidney androgen	chr6:135,257,471-135,261,270
I	I	1439373_x_at	A 26	P 58/P 338	/P 1120	wnt5a	chr14:23,047,838-23,061,639
I	I	1451882_a_at	A 131	P 237	P 307	Fgf-8	chr19:45,875,846-45,881,678
I	I	1427257_at	A 114	P 209	P 265	Cspg2 = chondroitin sulfate	chr13:87,830,048-87,861,139
I	I	1436869_at	A 34	P 97	P 423	Shh	chr5:26,708,829-26,717,738
I	I	1423287_at	A 8	P 83	P 451	Cbln1=cerebellin 1 precursor	chr8:88,361,530-88,363,730
I	I	1454623_at	P 382	P 1057	P 2087	Ela3b =elastase 3B,	chr4:136,200,429-136,209,938
I	I	1418480_at	A 31	P 59	P 124	pro-platelet basic protein	chr5:91,233,411-91,234,954
I	M	1438532_at	P 60	P 130	P 124	Weakly similar to EMR1	chr1:153,977,589-153,999,848
I	D	1420465_s_at	A 109	P 408	A 82	Mup1	chr4:59,973,896-60,053,738
M	I	1448870_at	A 81	A 39	P 367	latent TGF beta binding	chr17:75,579,733-75,973,903
M	I	1427086_at	A 50	A 78	P 277	slit homolog 3	chr11:35,349,399-35,353,210
M	I	1418457_at	A 21	A 48	P 142	CXC chemokine MIP-2gamma	chr13:56,067,456-56,074,288
M	I	1449335_at	A 107	PA 78	P 197	Timp3 =tissue inhibitor of	chr10:88,700,332-88,749,302
M	I	1428571_at	P 300	P 470	P 1150	Col9a1=procollagen, type IX,	chr1:24,411,500-24,424,881
M	D	1427883_a_at	P 1623	P 1898	P 545	Col3a1	chr1:46,409,270-46,426,544
M	D	1451866_a_at	P 166	P 154	A 39	Hgf =hepatocyte growth	chr7:80,993,460-81,011,344
M	D	1416211_a_at	P 1255	P 1354	P 689	pleiotrophin = Heparin	chr7:136,328,128-136,444,578
M	D	1442884_at	P 155	P 136	A 18	Hepatocyte growth factor	chr5:14,505,878-14,506,545
D	I	1423635_at	P 56	MP 26	P 143	Bmp2 =bone morphogenetic	chr2:133,695,392-133,704,100
D	I	1450716_at	P 714	P 201	P 328	A disintegrin and	chr16:87,041,030-87,049,612
D	M	1416594_at	P 160	A 19	A 11	Sfrp1 =secreted frizzled-	chr8:22,308,834-22,344,203
D	M	1423669_at	PPA 101	A 21	A 13	Col1a1=collagen pro-alpha-1	chr11:94,519,873-94,535,468
D	M	1448594_at	P 82	A 17	A 12	Wisp1=WNT1 inducible	chr15:68,410,917-68,442,724
D	M	1415806_at	P 134	A 47	MP 59	plasminogen activator,	chr8:21,615,658-21,640,756
D	M	1449425_at	P 134	A 42	A 25	wnt2	chr6:17,800,811-17,841,905
D	M	1416342_at	P 127	A 33	A 28	tenascin C (Tnc)	chr4:62,549,179-62,549,452
D	M	1423607_at	P 263	P 95	P 107	Lum: Lumican	chr10:100,091,060-100,098,017
D	M	1460668_at	P 347	AP 67	AP 73	galanin (Gal)	chr19:3,213,837-3,218,378
D	M	1460465_at	P 402	PM 65	53 MA	Hypothetical fibronectin	chr6:66,266,815-66,302,187
D	M	1429348_at	P 111	PA 53	PA 58	Sema3c	chr5:15,506,131-15,689,676
D	D	1420417_at/1	P 580/PA 71	A 32/P210	A 3/P 97	Sema3a =sema domain,	chr5:11,978,397-12,181,653
D	D	1456515_s_at	P 179	P 74	A 30	Col9a3=procollagen, type IX,	chr2:180,425,362-180,433,408
D	D	1440147_at	P 152	P 35	MP 16	Leucine-rich secreted	chr5:51,709,922-51,745,321

**Fig. 23\_ Listado de genes obtenidos en el experimento de Microarrays.**

**A:** Listado de los genes que codifican para factores de transcripción tipo homeodominio . **B:** Listado de genes que codifican para factores de transcripción no homeodominio. **C:** Listado de genes que codifican para proteínas transmembrana. **D:** Listado de genes que codifican para factores secretados. Los distintos perfiles se representan con distintos colores I/I: amarillo; I/M: azul claro; I/D: naranja; M/I: marrón claro; M/D: morado; D/I: verde; D/M: verde caqui; D/D: azul.

Fig. 24

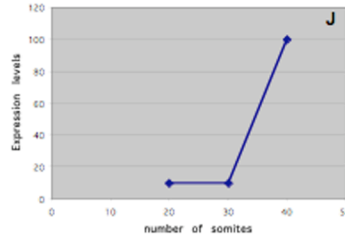
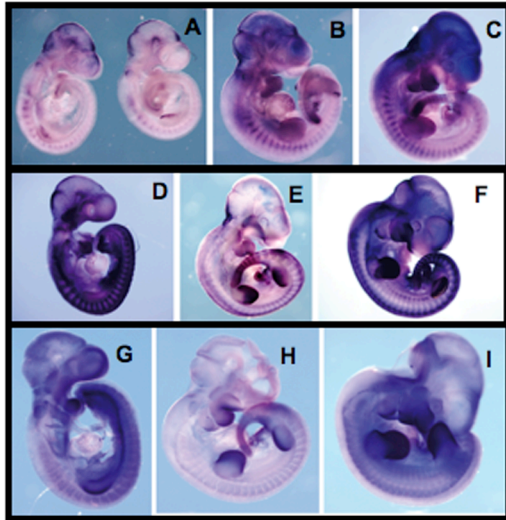


**Fig. 24\_Hibridación in situ de genes con perfil ascendente (I/I)**

**A-C:** Patrón de expresión del gen de la proteína transmembrana AIGP3/SerinC5. **D-F:** Patrón de expresión del gen de la proteína secretada CXCL14. **G-I:** Patrón de expresión del gen de la precerebelina, precursor de la proteína secretada cerebelina1 (Cbln1). **J-L:** Patrón de expresión del gen de la proteína integral de membrana *lmg* (*Integral membrana glicoprotein*)/Lrig1. **M-N:** Patrón de expresión del gen del factor de transcripción Prdm16. **O-Q:** Patrón de expresión de la proteína transmembrana *Tmp* (*Transmembran Membrane Protein RIKENcDNA9030408N13*). **S:** Perfil de expresión de los microarrays; el eje x representa número de somitos y el eje Y los niveles de expresión en cada estadio.

**Fig. 25**

**Genes con perfil ascendente  
entre 30 y 40s (gen distal)**

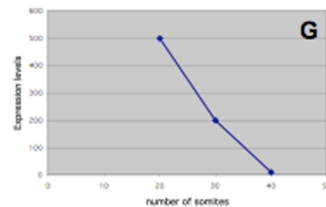
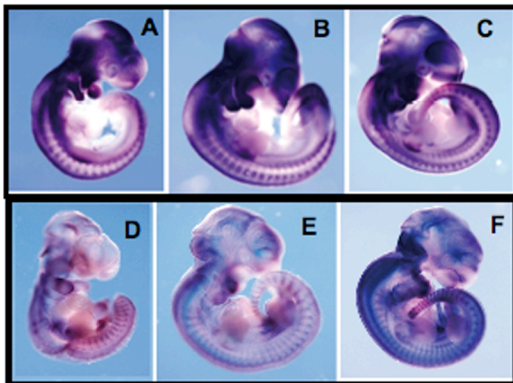


**Fig. 25\_ Hibridación in situ de genes con perfil ascendente entre 30 y 40s (M/I)**

**A-C:** Patrón de expresión de la proteína transmembrana Emp1 (*Epithelial Membrane Protein1*). **D-F:** Patrón de expresión del gen de la glicoproteína de membrana Neuropilina 2 (*Nrp2*). **G-I:** Patrón de expresión del gen del factor secretada Frangilis 2/*Itfm1*. **J:** Perfil de expresión de los microarrays.

**Fig. 26**

**Genes con perfil de expresión descendente  
(Patrón proximal-medial)**

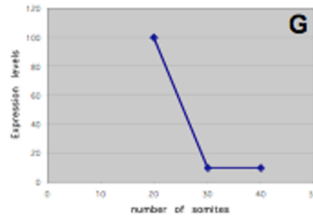
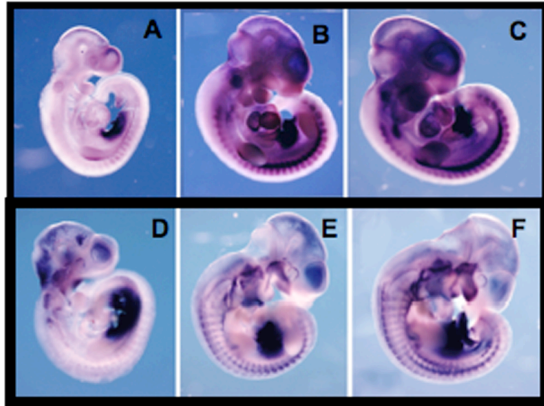


**Fig. 26\_ Hibridación in situ de genes con perfil descendente (D/D)**

**A-C:** Patrón de expresión del gen del factor de transcripción Nr2f1/COUP-TF1. **D-F:** Patrón de expresión del gen de la proteína de membrana PlexinA2. **G:** Perfil de expresión de los microarrays.

Fig. 27

**Genes con perfil descendente entre 20 y 30 s (gen proximal)**

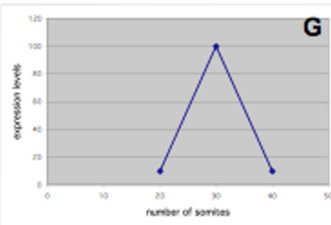
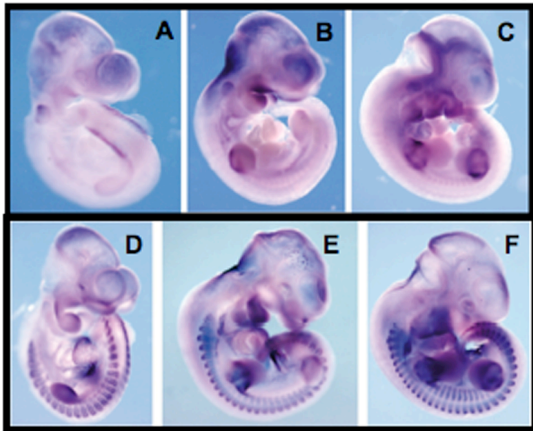


**Fig. 27\_ Hibridación in situ de genes con perfil descendente entre 20 y 30 (D/M)**

A-C: Patrón de expresión del gen del factor secretado *Wisp1* (*Wnt1-inducible signaling pathway protein*). D-F: Patrón de expresión del gen del factor de transcripción *Pstn* (*Periostin*)/*Osf2* (*Osteoblast specific factor*)/*Runx2*. G: Perfil de expresión de los microarrays.

Fig. 28

**Genes con máxima expresión a 30s (gen con patrón medial)**

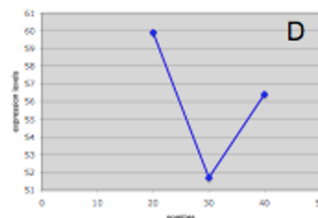
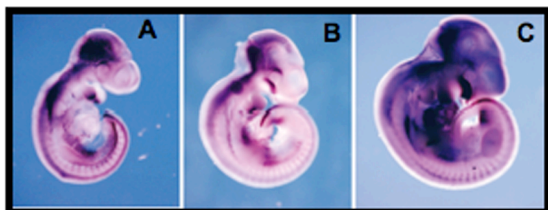


**Fig. 28\_ Hibridación in situ de genes con máxima expresión en 30s (I/D).**

A-C: Patrón de expresión del gen de la proteína transmembrana *Slitrk6*. D-F: Patrón de expresión del gen de la proteína integral de membrana *Itm2a* (*Integral membrane protein 2a*). G: Perfil de expresión de los microarrays.

Fig. 29

**Genes con la expresión más baja en 30s:  
Hypothetical fibronectin type III domain containing protein**



**Fig. 29\_ Hibridación in situ de genes con perfil D/I**

A-C: Patrón de expresión del gen de la proteína HFT (*Hypothetical fibronectin type III domain containing protein*). D: Perfil de expresión de los microarrays.

Tabla. 2

	<i>Proteínas transmembrana</i>	<i>FT no homeodominio</i>	<i>Factores secretados</i>
<b>Genes seleccionados</b>	14	5	9
<b>amplificados por PCR</b>	13	5	9
<b>Sondas RNA</b>	13	5	9
<b>Expresión en la extremidad</b>	12	4	5
<b>Expresión restringida en la extremidad</b>	12	2	3
<b>No expresión en la extremidad</b>	1	1	2

#### Conclusiones del estudio transcriptómico mediante hibridación en Microarrays:

- *La mayoría de los genes analizados tienen un perfil de expresión que correlaciona bastante bien con la dinámica de expresión mostrada en la hibridación in situ.*
- *La gran cantidad de proteínas homeodominio obtenidas en los microarrays, la mayoría con funciones en formación de patrón, evidencia el enriquecimiento de los resultados de los microarrays en este tipo de genes.*
- *Un alto porcentaje de genes encontrados en los microarrays corresponden a proteínas de adhesión celular no descritas; ésta representan los últimos eslabones de las vías que regulan la formación de patrón y constituyen un campo de conocimiento todavía inexplorado en el desarrollo de la extremidad.*
- *La mayoría de los genes seleccionados para su análisis por hibridación in situ no sólo tienen un patrón de expresión específico en la extremidad, sino también en otras partes del embrión que pueden ser objeto interés para otros investigadores.*

## **2. Análisis monográfico de la quimioquina CXCL14 y el factor de transcripción PRDM16 durante el desarrollo embrionario.**

De todos los genes analizados en el experimento de Microarrays, seleccionamos dos de ellos para la realización de un análisis funcional de los mismos.

Uno de ellos codifica para la proteína **CXCL14**, perteneciente a la familia de las quimioquinas, proteínas básicas de bajo peso molecular implicadas en el tráfico leucocitario durante la respuesta inmune. Las razones que nos impulsaron a escoger este gen fueron las siguientes:

- El patrón de expresión tanto en la extremidad como en todo el embrión de ratón presenta una gran especificidad de tejido y un gran dinamismo a lo largo del desarrollo.
- Por otro lado se conoce muy poco sobre el papel de las quimioquinas en embriogénesis. La única quimioquina estudiada en este contexto es el SDF1, implicado en el desarrollo del sistema inmune, sistema vascular y sistema nervioso (Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998; Klein et al., 2001; Bagri et al., 2002; Lazrini et al., 2003). En la extremidad, SDF1 es necesario para la regionalización y supervivencia de precursores musculares (vasyutina et al., 2005)
- La generación del patrón músculo-esquelético en la extremidad de vertebrados es un campo todavía poco explorado y las quimioquinas, entre ellas CXCL14 y SDF1, podrían desempeñar un papel importante en este proceso.

El segundo gen que elegimos codifica para un factor de transcripción tipo zinc-finger, denominado **Prdm16** (PR domain containing protein 16). Las razones principales por las cuales seleccionamos este gen fueron las siguientes:

- El patrón de expresión de este gen es muy interesante, ya que muestra una señal muy específica e intensa en sitios muy localizados del embrión. En la extremidad se expresa por todo el esbozo desde el inicio de esta estructura.
- Además, el dominio PR está implicado en la remodelación de la cromatina, y por tanto cabe la posibilidad de que este factor de transcripción actúe como cofactor de otros genes con una expresión más amplia en el embrión, haciéndoles competentes para ejercer su función en la extremidad. También podría ejercer la función de cofactor de genes implicados en formación de patrón en la extremidad como los genes *Hox*.

## **2.1. Estudio de la quimioquina CXCL14 en el desarrollo de la extremidad de vertebrados**

El patrón de expresión y la gran conservación evolutiva de CXCL14, que únicamente comparte con SDF1, sugieren que esta quimioquina podría desempeñar un papel importante en la morfogénesis de distintos tejidos durante el desarrollo de la extremidad.

Por tanto es el tema de este proyecto estudiar la función de esta proteína en este contexto, para lo cual, nos fijamos los siguientes **objetivos**:

- Estudio del patrón de expresión de CXCL14 en el embrión de ratón y de pollo, y comparación con el patrón de expresión de SDF1.
- Estudio en detalle del patrón de expresión de CXCL14 en la extremidad de vertebrados y comparación con la expresión de otros marcadores específicos de tejido.
- Estudio de la función de CXCL14 en la extremidad del pollo.

### 2. 1. 1. Patrón de expresión de CXCL14 en el embrión de ratón y pollo

Para estudiar el patrón de expresión de CXCL14 en embriogénesis, realizamos experimentos de hibridación in situ en el embrión de ratón y de pollo a distintos estadíos.

#### Ratón

A E9,5 (**Fig. 30A**) cuando el esbozo de la extremidad se hace visible, se observa señal de la CXCL14 en el ectodermo ventral del flanco y de la propia extremidad. También se puede ver expresión en la vesícula ótica, parte ventral del cerebro medio y en el télencéfalo (**Fig. 30A**)

A E10,5 (**Fig. 30B**) se observa una fuerte expresión en el ectodermo y mesénquima de los arcos branquiales y en los espacios intersomíticos; A continuación de los arcos branquiales, en dirección caudal, una mancha intensa marca la expresión correspondiente a los ganglios periféricos IX y X (**flecha en Fig. 30B**). En la extremidad se observa una expresión mesenquimal fuerte en el centro del eje AP y un poco más débil en el extremo posterior-distal; en el ectodermo, la señal es muy intensa en la parte proximal.

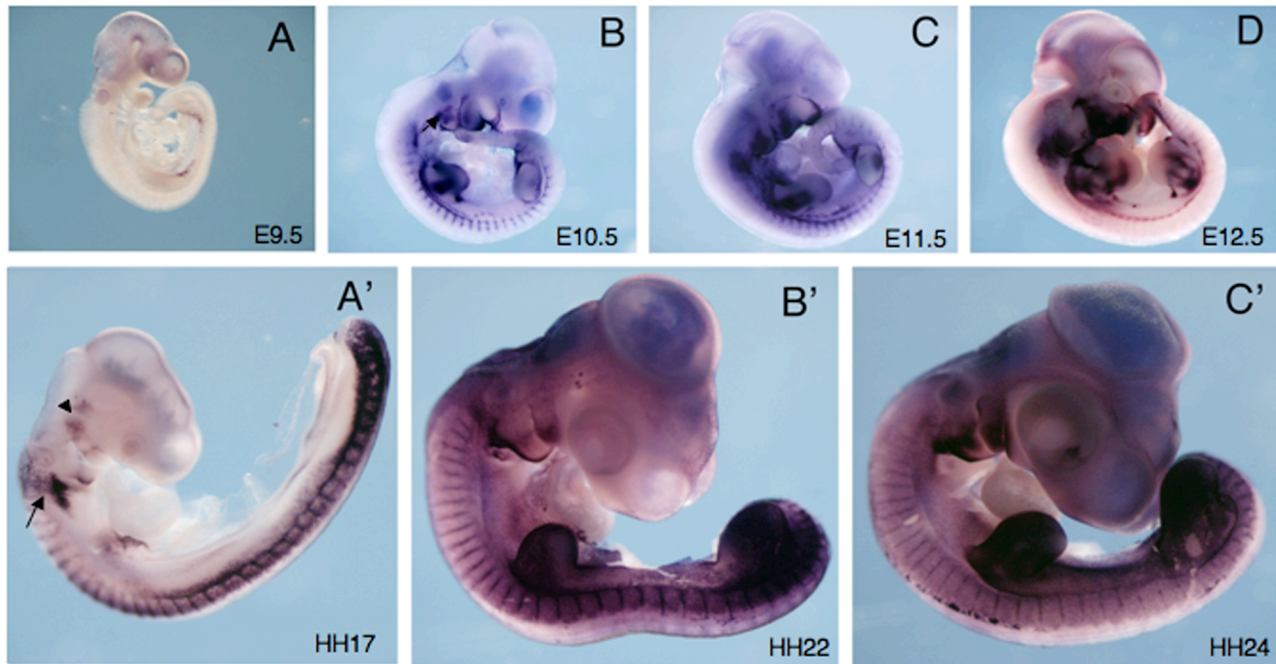
A E11,5 (**Fig. 30C**) de desarrollo la expresión de los arcos branquiales se hace más intensa, y el dominio de expresión mesenquimal en la extremidad se disgrega en dos franjas de expresión independientes. Así mismo, a E12,5 (**Fig. 30D**), esta señal de la extremidad evoluciona definiendo regiones específicas dentro del autopodio. En este estadio la expresión en los espacios intersomíticos ha desaparecido.

#### Pollo

A estadio HH17(**Fig. 30A'**), se observan altos niveles de expresión en el ectodermo de la pared del tronco y de las extremidades, que empiezan a emerger del flanco. Los somitos también poseen una fuerte expresión de la quimioquina, que, como se ve en secciones que se mostrarán más adelante, se restringe al dermomiótomo (**Fig. 30B'**). El transcrito de CXCL14 también se detecta en los ganglios trigéminos (**punta de flecha en Fig. 30A'**) y arcos branquiales. Al igual que en ratón se observa una expresión intensa en el IX y X ganglios periféricos (**flecha en Fig. 30A'**). A HH22 y HH24 la expresión en el ectodermo permanece y se hace más intensa en extremidades y arcos branquiales (**Fig. 30B',C'**).



**Fig. 30**



**FIG. 30\_ Patrón de expresión de CXCL14 durante el desarrollo embrionario de ratón y pollo.**

**A-D:** Hibridación in situ con la sonda de CXCL14 en embriones de ratón de 9.5 dpc (A), 10.5 dpc (B), 11.5 dpc (C) y 12.5 dpc (D); **A'-C':** Hibridación in situ con la sonda de CXCL14 en embriones de pollo de estadio HH17 (A'), HH22 (B') and HH24 (C'). Flechas en B y en A' señalan la expresión de CXCL14 en el IX y Xth ganglio craneal. Punta de flecha en A' apunta al uno de los ganglio trigémino.

## **2. 1. 1. 1. Comparación del patrón de expresión de CXCL14 con la expresión de SDF1 en embriogénesis**

Cómo ya se ha explicado anteriormente, CXCL14 y SDF1 tienen ciertas características que las hacen únicas dentro de la familia de las quimioquinas. En primer lugar, son las dos quimioquinas más conservadas evolutivamente, además de ser las más antiguas. En segundo lugar, ambas poseen funciones no ligadas al proceso inflamatorio (aunque el SDF1 también tenga una función en este proceso). En tercer lugar, en el animal adulto ambas se expresan fuertemente en tejidos epiteliales, (Agace et al., 2000; Kurth et al., 2001; Schaerli et al., 2005) y en cuarto y último lugar, son las dos únicas quimioquinas expresadas en la extremidad. Por todas estas razones, hipotetizamos que estas dos quimioquinas pudiesen estar cooperando en determinados procesos celulares.

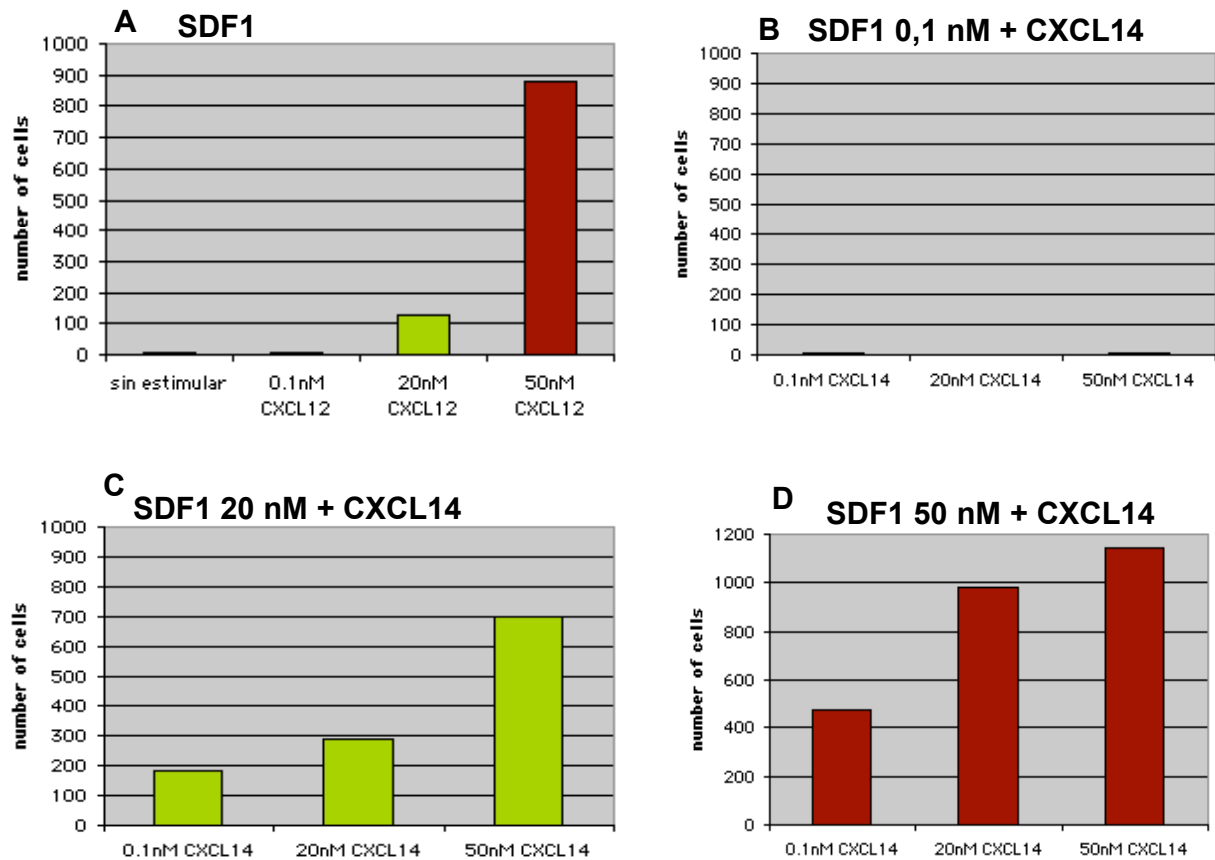
Cómo una de las funciones clásicas de las quimioquinas es promover la migración celular, decidimos estudiar la migración celular en respuesta a estas dos quimioquinas. Para ello escogimos una línea celular L1.2, generada a partir de células pre-B de ratón, muy utilizada para este tipo de experimentos. Estas células se siembran sobre unos cestillos que se colocan encima de unos pocillos de medio sin suero con una concentración determinada de quimioquina.

El diseño experimental consistía en fijar unas concentraciones de SDF1 e ir aumentando las de CXCL14 para cada una de ellas. A 0,1nM de SDF1 las células no migran y tampoco lo hacen con concentraciones crecientes de CXCL14 (la respuesta migratoria de las células al estimularlas sólo con CXCL14 también es nula; ésto se discute en la discusión), mientras que a 20nM de SDF1 las células migran en respuesta a SDF1, respuesta que va aumentando según vamos



subiendo las concentraciones de CXCL14. A 50nM, el número de células que migran a través del cestillo también aumenta cuando se añade CXCL14, pero el aumento es notablemente menor que a 20nM de SDF1 (**Fig. 31**).

**Fig. 31**



**Fig. 31\_Curva de migración de SDF1 con distintas concentraciones de CXCL14**

- Con estas observaciones podemos concluir que a ciertas concentraciones de SDF1 y CXCL14 existe una sinergia entre ambas quimioquinas en relación a la migración celular.

Teniendo en cuenta estos datos y las peculiaridades las dos quimioquinas, decidimos estudiar si existía alguna correlación entre la expresión de *SDF1* y *CXCL14* en el embrión, llevando a cabo experimentos de hibridación in situ en secciones consecutivas.

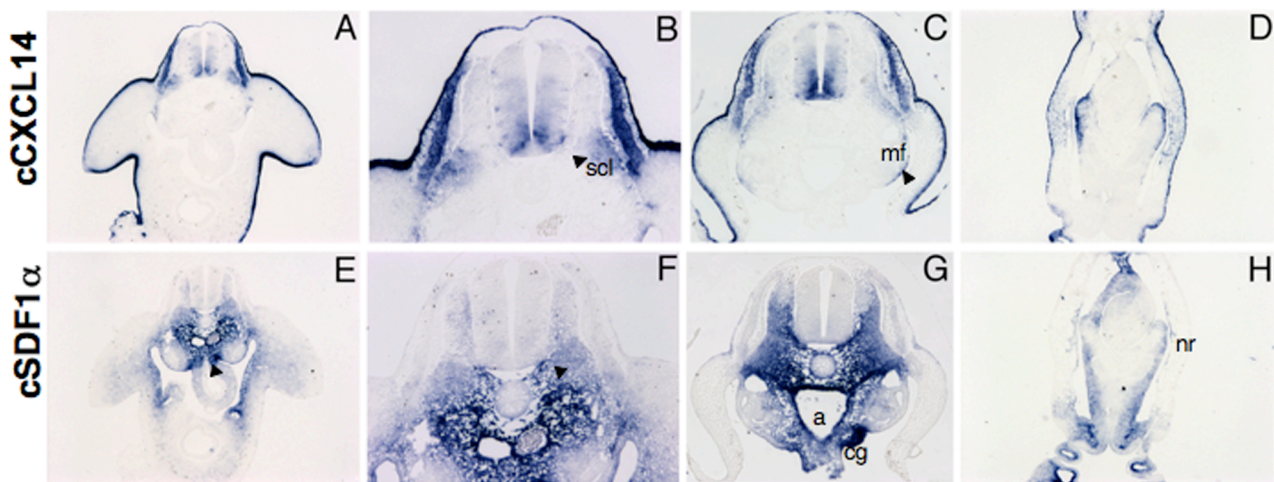
En ratón, a pesar de la extrema complementariedad entre las dos quimioquinas observada en la extremidad, donde el *SDF1* ocupa el mesénquima central (**Fig. 35D**) mientras *CXCL14* se localiza en el ectodermo ventral y dorsal y en sendas poblaciones subectodérmicas (**Fig. 35C**), en el resto del embrión, *CXCL14* se detecta únicamente en el ectodermo del cuerpo y cabeza, y, aunque no ocupan dominios solapantes, las dos quimioquinas no presentan complementariedad (datos no mostrados).

Por el contrario, la hibridación in situ con la sonda de *SDF1* y *CXCL14* sobre secciones de un embrión de pollo de HH20 (**Fig. 32**), demuestra una extraordinaria complementariedad en un gran número de tejidos, así como un solapamiento de ambas quimioquinas en algunos de ellos.

Secciones realizadas al nivel de la extremidad posterior, muestran una expresión fuerte de *CXCL14* en el dermomiótomo, y también en el esclerotomo (**punta de flecha en Fig. 32B**) aunque con menor intensidad, donde solapa con *SDF1* (**Fig. 32E e imagen magnificada en F**). Mientras que la *CXCL14* se expresa en la mitad ventral del tubo neural (**Fig. 32A-C**), *SDF1* se encuentra en el mesénquima adyacente rodeando a los ganglios de las raíces dorsales (**Fig. 16G**); la expresión del segundo en esta región es continua con la señal del esclerotomo y se extiende hasta la zona Aorta-Gónada-Mesonefros (AGM) y mesenterio dorsal (**Fig. 32E-G**), siendo especialmente intensa en el mesénquima que rodea a la aorta y en el mesenterio dorsal (**punta de flecha en Fig. 32E**). Además, se observa una clara complementariedad en las extremidades donde *CXCL14* se expresa en todo el ectodermo, excluyendo el AER, y *SDF1* en el mesénquima central (**Fig. 32A, B; Fig. 32A, B**)

En secciones realizadas a un nivel más rostral de la extremidad posterior (**Fig. 32C,G**), el mRNA de *CXCL14* se encuentra en el epitelio que recubre el mesonefros (**punta de flecha en Fig. 32C**) y el *SDF1* en el mesénquima adyacente (**Fig. 32G**); lo mismo se observa en secciones longitudinales (**Fig. 32D,H**)

**Fig. 32**



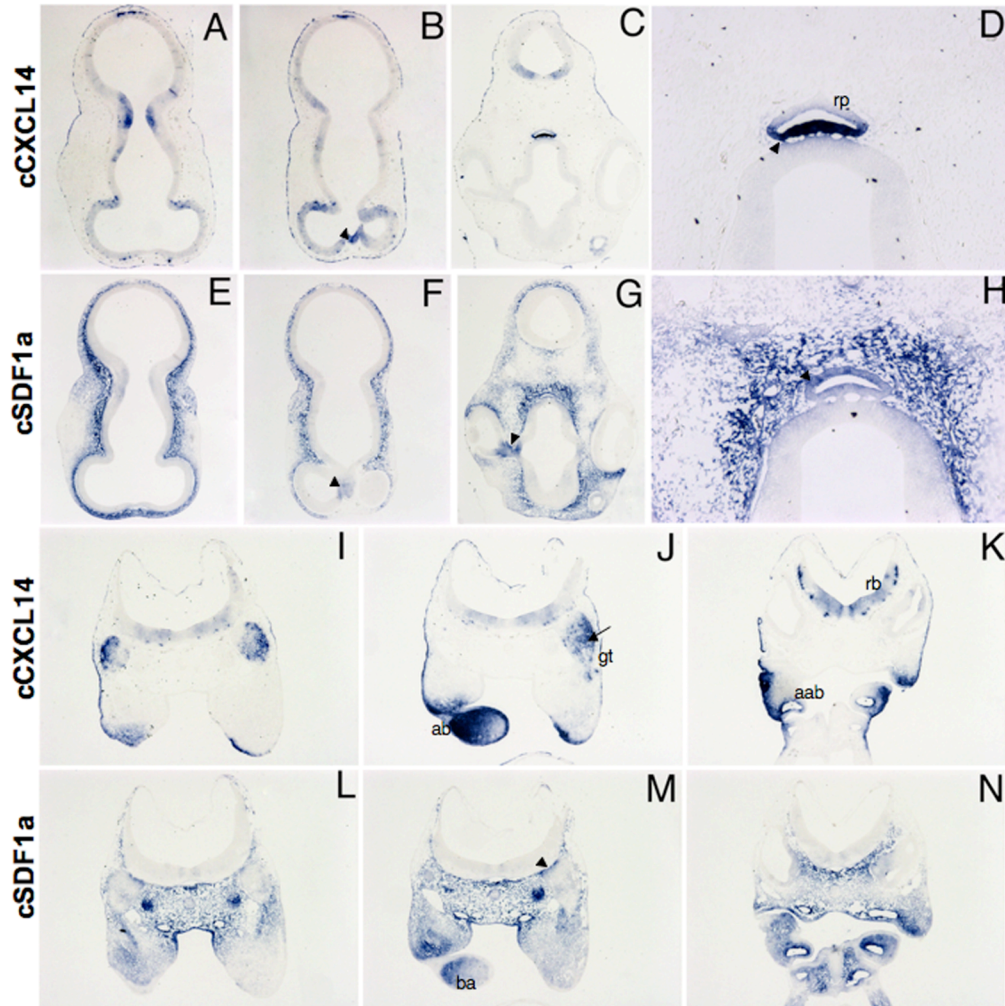
**Fig. 32. Comparación del patrón de expresión de *CXCL14* y *SDF1* en embrión de pollo de estadio HH20.**

Hibridación in situ de *CXCL14* (A-D) y *SDF1* (E-H) en secciones consecutivas de parafina. A, E: secciones transversales al nivel de las extremidades posteriores. B, F: imágenes magnificadas de A y E, respectivamente. C, G: secciones del tronco más rostrales que las observadas en A y E. D, H: secciones longitudinales donde se ve la región del mesonefros y del tubo digestivo. La punta de flecha en E señala la expresión de *CXCL14* en el mesenterio dorsal. Puntas de flecha en B y F apuntan a la señal en el esclerotomo. Punta de flecha en C muestra la expresión de *CXCL14* en el epitelio celómico que cubre el mesonefros. scl: sclerotomo; a: aorta; mf: mesonefros; cg: cresta genital

En la región cefálica existe una correlación negativa en los dominios de expresión de ambas quimioquinas. Mientras *CXCL14* se expresa en el ectodermo que recubre la cabeza, *SDF1* se localiza en el mesénquima subyacente (**Fig. 33A-C, E-G**). Respecto al SNC, *CXCL14* aparece en el neuroepitelio y en algunas neuronas del prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo, y el único solapamiento de ambas quimioquinas se presenta en la unión de las vesículas telencefálicas (**puntas de flecha en Fig. 33B, F**). Resulta muy interesante la expresión de *CXCL14* en la mitad anterior del *Rathke's pouch* (**punta de flecha en Fig. 33D**), estructura que dará lugar a la parte anterior de la pituitaria (adenohipófisis), donde *SDF1* se expresa más homogéneamente, pero con mayor intensidad en la mitad posterior (**punta de flecha en Fig. 33H**), y por tanto en un dominio complementario al de *CXCL14*. En una zona más caudal de la cabeza, se ve una tinción muy fuerte de *CXCL14* en el ganglio trigémino (**Flecha en Fig. 33J**) y una expresión complementaria de *SDF1* en el mesénquima inmediatamente adyacente (**punta de flecha en Fig. 33M**).

*CXCL14* se expresa en el ectodermo y en el mesénquima de arcos branquiales, solapando en este último con *SDF1* (Fig. 33I-N). En las arterias de los arcos branquiales ambas quimioquinas se expresan en el endotelio, aunque la señal de *SDF1* también abarca el mesénquima de alrededor (Fig. 33K, N).

**Fig. 33**



**Fig. 33\_ Patrón de expresión de *CXCL14* y *SDF1* en la cabeza y Sistema Nervioso Central (SNC) de un embrión de pollo de estadio HH20**

**A-D:** Hibridación in situ en secciones de parafina que muestra la expresión de *CXCL14* en la región cefálica y neuroepitelio. **E-H:** Secciones consecutivas a las anteriores, mostrando el patrón de expresión de *SDF1* en estas regiones. **D, H:** imágenes magnificadas de C y G, respectivamente. **I-K:** Distribución del mRNA de *CXCL14* en arcos branquiales y partes caudales del encéfalo. **L-N:** Secciones consecutivas a las de I-K mostrando la distribución del mRNA de *SDF1*. Puntas de flecha en B y F remarcan la expresión entre las dos vesículas telencefálicas. Punta de flecha en D señala la expresión de *CXCL14* en la parte anterior del *Rathke's pouch*, mientras que la punta de flecha en H marca la expresión de *SDF1* en la parte posterior de esta estructura. Punta de flecha en G resalta la expresión de *SDF1* en el tallo óptico. La flecha en J marca uno de los ganglios trigéminos, y la punta de flecha en M señala la expresión de *SDF1* en el mesénquima adyacente. rp: Rathke's pouch; tg: ganglio trigémino; ab: arco branquial; aab: arteria de arco branquial; rb: romboencéfalo

- *En conclusión, se puede decir que la expresión de CXCL14 en el ectodermo se encuentra conservada entre ratón y pollo, mientras que la expresión mesenquimal sólo es equivalente en estadios tardíos entre las dos especies.*
- *La comparativa con SDF1, pone de manifiesto que la expresión de ambas quimioquinas es complementaria en muchos de los tejidos analizados, lo que sugiere la posibilidad de una interacción entre ellas a nivel funcional.*

## **2. 1. 1. 2. Patrón de expresión de CXCL14 en el desarrollo de la extremidad**

### Ratón

La expresión de CXCL14 en la extremidad de ratón mostraba un patrón totalmente nuevo y dinámico, y por ello decidimos abordarlo en más detalle incluyendo una comparación con su patrón de expresión en la extremidad del pollo. Como ya se ha comentado anteriormente, a E10,5 (**Fig. 34A**), CXCL14 se expresa en un dominio mesenquimal localizado en la mitad del eje antero-posterior (A-P), que en realidad corresponde a una población mesenquimal subectodérmica situada en la mitad dorsal, como se puede ver en una hibridación in situ realizada sobre secciones de parafina del mismo estadio (**Fig. 35C**).; en esta sección también se pudo observar una población similar incipiente en la mitad ventral, además de una clara expresión en el ectodermo dorsal y ventral que se encuentra ausente en el AER (**Fig. 35C**). Independientemente del dominio central y en una posición más distal a éste, aparece una señal más tenue y ligeramente más posterior (**punta de flecha en Fig. 34A**)

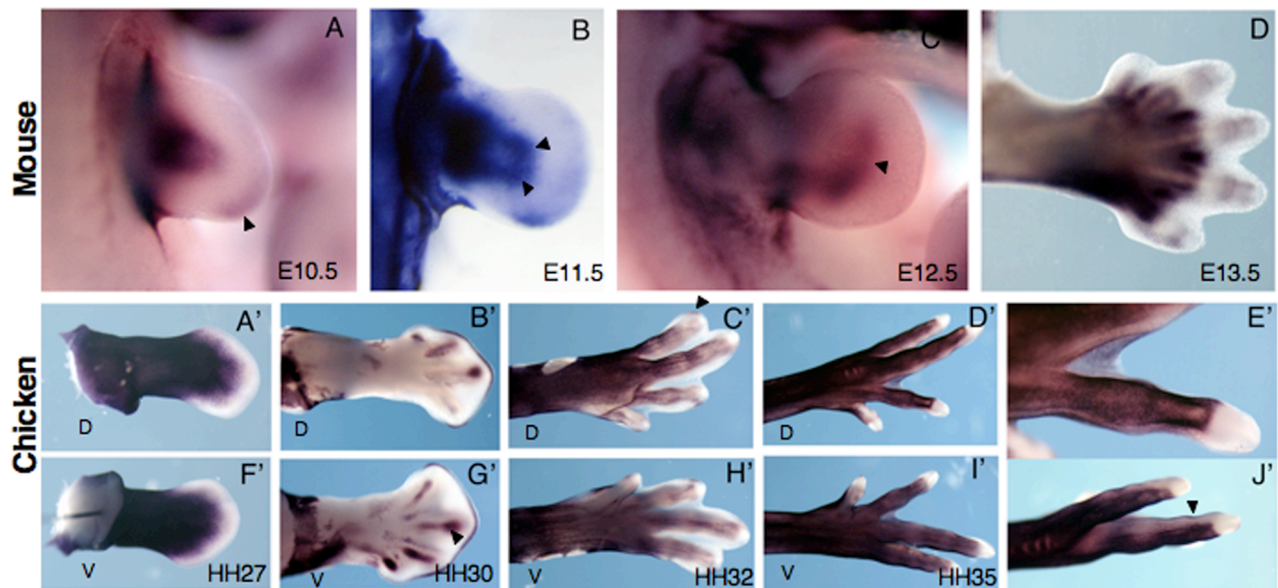
A E11,5 (**Fig. 34B**), la expresión en el mesénquima dorsal se bifurca en dos elementos que parecen seguir la misma dinámica de crecimiento de las pre-condensaciones cartilaginosas que van a dar lugar a los elementos esqueléticos (**puntas de flecha en Fig. 34B**). A E12,5 (**Fig. 34C**), el dominio de expresión en el mesénquima sigue evolucionando, adquiriendo la forma del arco digital (**punta de flecha en Fig. 34C**). Al mismo tiempo que aparece este arco de expresión desaparece el dominio de expresión más distal. A E13,5, CXCL14 se expresa alrededor de los tendones, en los interdígitos, y en las uniones entre las falanges (**Fig. 34D**).

### Pollo

Desde estadio HH17 a HH27, la expresión de CXCL14 en la extremidad del embrión de pollo es poco variable, ya que se expresa en el ectodermo dorsal y ventral durante todo este periodo. No obstante alrededor de estadio HH27, la señal se hace más dinámica y empieza a desaparecer del ectodermo más distal, a la vez que aparece una expresión nueva en el mesénquima (**Fig. 34A'**). A HH30, la quimioquina se expresa en los primordios de los tendones, aunque esta expresión parece más adelantada en ventral que en dorsal (**Fig. 34B', F'**). A HH32 (**Fig. 34C', G'**), la señal se localiza alrededor de los tendones tanto en una visión ventral como dorsal. A HH35 (**Fig. 34D', I'**), por el contrario, la expresión es generalizada por todo el ectodermo a excepción de la punta (**flecha en Fig. 34E'**) y el lateral de los dígitos (**punta de flecha en Fig. 34I'**).



**Fig. 34**

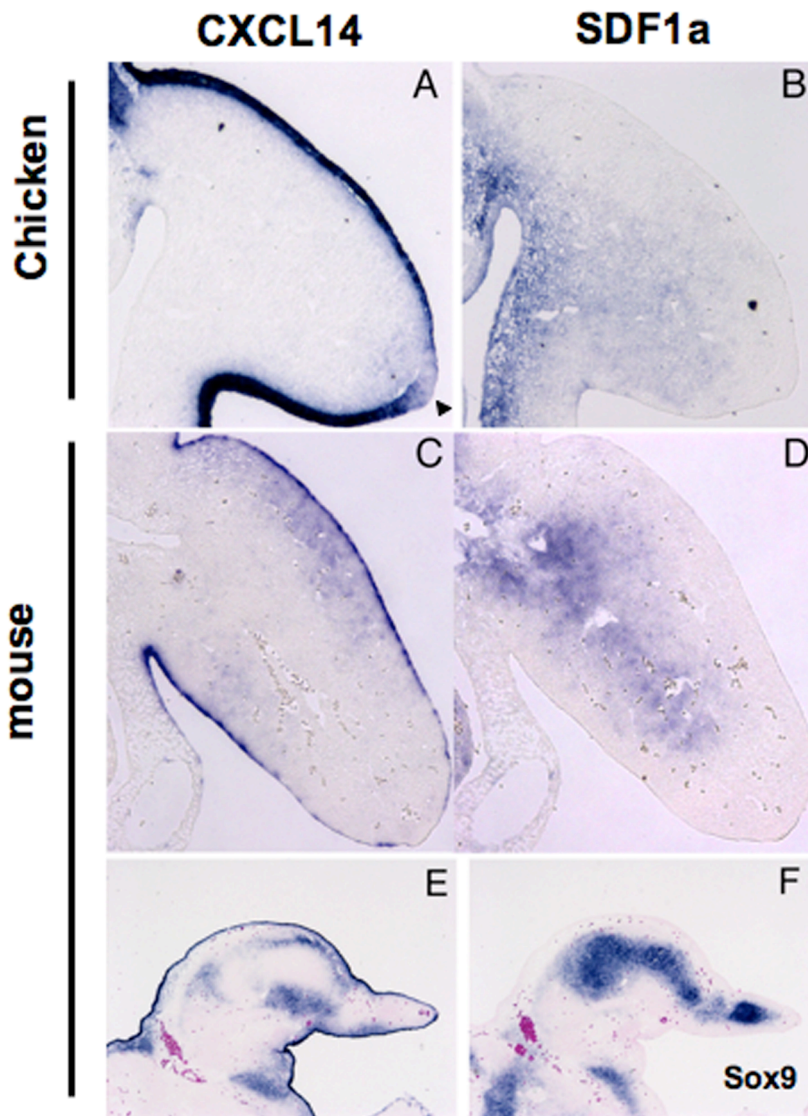


**Fig. 34. Patrón de expresión de CXCL14 durante el desarrollo de la extremidad de pollo y ratón.**

Hibridación in situ de CXCL14 durante el desarrollo de la extremidad de ratón (A-D) y de pollo (A'-J'). A-D: Vista dorsal de extremidades de ratón a 10.5 dpc (A), 11.5 dpc (B), 12.5 (C) dpc and 13.5 (D) dpc. La punta de flecha en A indica la expresión de CXCL14 en un grupo de células del mesénquima distal. Las puntas de flecha en B marcan las dos franjas de expresión en las que se disgrega el dominio de expresión mesenquimal de CXCL14; la punta de flecha en C indica la expresión de CXCL14 que recuerda la forma del arco digital. A'-J': Extremidades posteriores de embrión de pollo a HH27, HH30, HH32 y HH35. A'-D': visiones dorsales; F'-I': visiones ventrales. B', G': extremidades con el ectodermo digerido por la proteinasa K para ver la expresión mesenquimal. E': imagen ampliada de D'. J': vista lateral ampliada de I'. La punta de flecha en G' remarca las franjas de expresión a lo largo del eje de los dígitos. La punta de flecha en C' apunta a un pequeño dominio mesenquimal de expresión debajo del AER. Flecha en E' y punta de flecha en J' remarcan la ausencia de expresión de CXCL14 en la punta y región lateral de los dígitos, respectivamente.

Para estudiar más en detalle la expresión de ambas quimioquinas en la extremidad, hicimos una hibridación in situ sobre secciones consecutivas de la extremidad a HH20 y E10,5 en pollo y en ratón respectivamente. En ambos casos se observa una complementariedad en la expresión de las dos quimioquinas, a pesar de que la expresión de CXCL14 en la extremidad es diferente en pollo y en ratón. En la extremidad de ratón, como ya se ha mencionado anteriormente, CXCL14 se expresa en el ectodermo dorsal y ventral y en dos poblaciones mesenquimales subectodérmicas (Fig. 35C). El SDF1, en cambio, se sitúa en el mesénquima central, limitado en el plano dorsal y ventral por estas dos poblaciones (Fig. 35D). Como se ve en la Fig. 35E estas dos poblaciones van a ir evolucionando siempre pegadas a las condensaciones cartilaginosas, como se observa al comparar la expresión de CXCL14 con la de Sox9, marcador de condensaciones pre-condrogénicas (Fig. 35 E,F). En el caso de la extremidad de pollo, CXCL14 se expresa a altos niveles en el ectodermo pero no en el mesénquima (Fig. 35A) y SDF1, cuya expresión está conservada evolutivamente, se localiza en el mesénquima central (Fig. 35B); de este modo, aunque constituyen dominios más alejados que en ratón, también son complementarios.

Fig. 35



**Fig. 35\_ Comparación del patrón de expresión de *CXCL14* y *SDF1* en la extremidad de ratón y de pollo**

Hibridación in situ en secciones consecutivas mostrando la distribución del mRNA de *CXCL14* y *SDF1* en la extremidad posterior de una embrión de pollo de estadio HH20 (**A,B**) y en la extremidad anterior de un embrión de ratón de E10.5 (**C,D**). La punta de flecha en A señala el AER, que no expresa *CXCL14*. **E,F**: Secciones sagitales consecutivas de una extremidad anterior de ratón de E12,5 mostrando la expresión de *CXCL14* (**E**) and *Sox9* (**F**).

- En conclusión, la expresión de *CXCL14* y *SDF1* en regiones complementarias de la extremidad como el ectodermo y el mesénquima, podría indicar una posible interacción entre ambas quimioquinas, bien llevando a cabo una actividad antagónica sobre alguna población celular, ó, por el contrario, una actividad cooperativa sobre poblaciones situadas en las interfases entre los dominios de expresión de cada una de ellas.

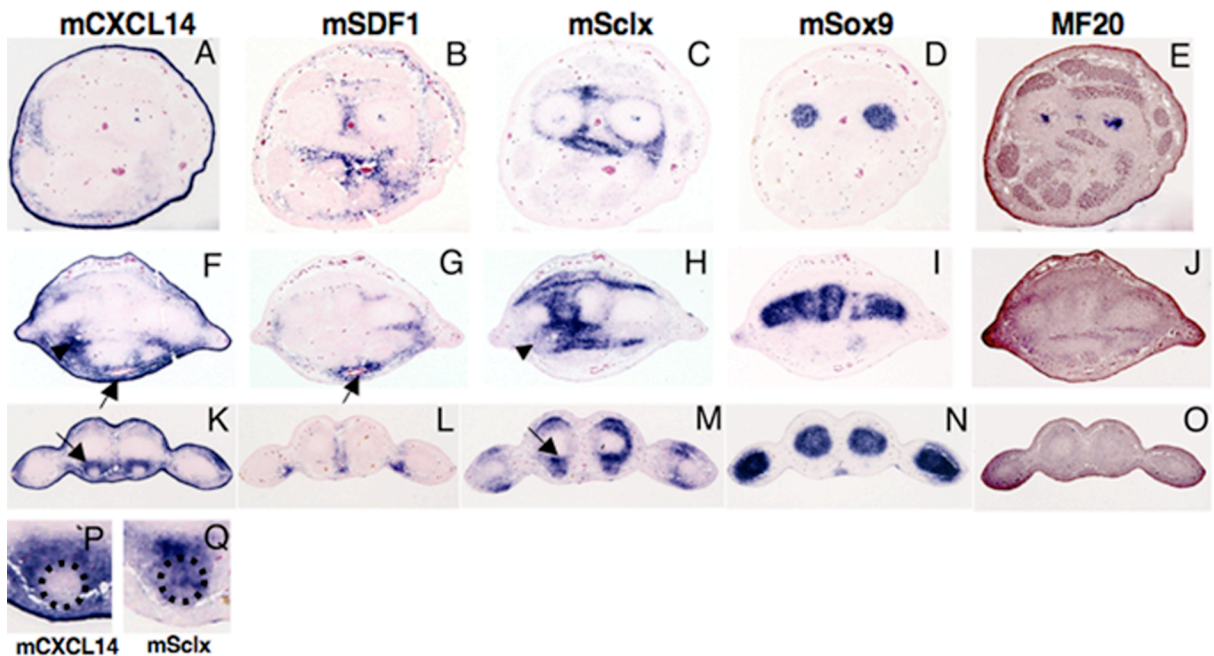
### CXCL14 se expresa en un dominio totalmente nuevo dentro del tejido conectivo de la extremidad

Las hibridaciones in situ en embriones enteros y en secciones sugerían que CXCL14 se expresaba en un tejido no descrito previamente. Por esta razón, y con el fin de establecer una relación espacio-temporal con los demás tejidos de la extremidad, decidimos llevar a cabo experimentos de hibridación *in situ* en secciones consecutivas de patas de E13,5 en ratón y HH31 en pollo, comparando el patrón de la quimioquina con el de otros marcadores específicos de tejido.

En una sección transversal del estilopodio de una pata de ratón de E13,5, CXCL14 se expresa únicamente en el ectodermo (este dato no se muestra en las figuras), mientras que en un corte al nivel del zeugopodio ya se observa un dominio de expresión de CXCL14 en el mesénquima periférico, rodeando parcialmente a la condensación de la ulna (Fig. 36A).

A este nivel proximo-distal CXCL14 no solapa con ninguno de los otros tejidos descritos en la extremidad (Fig. 36A-E) y tampoco con el tejido conectivo marcado por SDF1, localizado fundamentalmente en el mesénquima central, entre las condensaciones cartilagosas (Fig. 36B). En una sección más distal, al nivel de los metacarpales, la señal de la quimioquina se hace más intensa en el mesénquima y rodea el dominio de expresión de Scleraxis, marcador de tejido tendinoso. Es interesante la complementariedad con la que se presentan el dominio de CXCL14 y el de Scleraxis en algunas zonas (ver puntas de flecha en Fig. 36F y 36H). Esta correlación con Scleraxis, se hace todavía más evidente en los dígitos, donde CXCL14 se expresa en el tejido que rodea los tendones y en el tejido conectivo que los conecta con las condensaciones (flechas en Fig. 36K y 36M)

**Fig. 36**



**Fig. 36\_ Patrón de expresión de CXCL14, SDF1, y marcadores específicos de tejido a lo largo del eje proximo-distal de una extremidad de ratón de E13,5.**

Secciones consecutivas de parafina de una extremidad anterior de ratón de E13,5, cortadas transversalmente a la altura del zeugopodio (A-E), de los metacarpales (F-J) y de los dígitos (K-O). Hibridación in situ con la sonda de CXCL14 (A, F, K), SDF1a (B, G, L), scleraxis (sclx) (C, H, M) y Sox9 (D, I, N), e inmunohistoquímica de MF20 (E, J, O). P, Q: imagen ampliada de un tendón ventral.; la línea de puntos marca el área donde no se expresa CXCL14. Puntas de flecha en F y H muestran los dominios complementarios de CXCL14 y sclx. Las flechas en F y G resaltan la co-localización de CXCL14 y SDF1 en uno de los vasos ventrales de la región de los metacarpales. Las flechas en K y M señalan la coexpresión de CXCL14 y sclx en el tejido conectivo que conecta entre los blastemas de los tendones y las condensaciones condrogénicas.

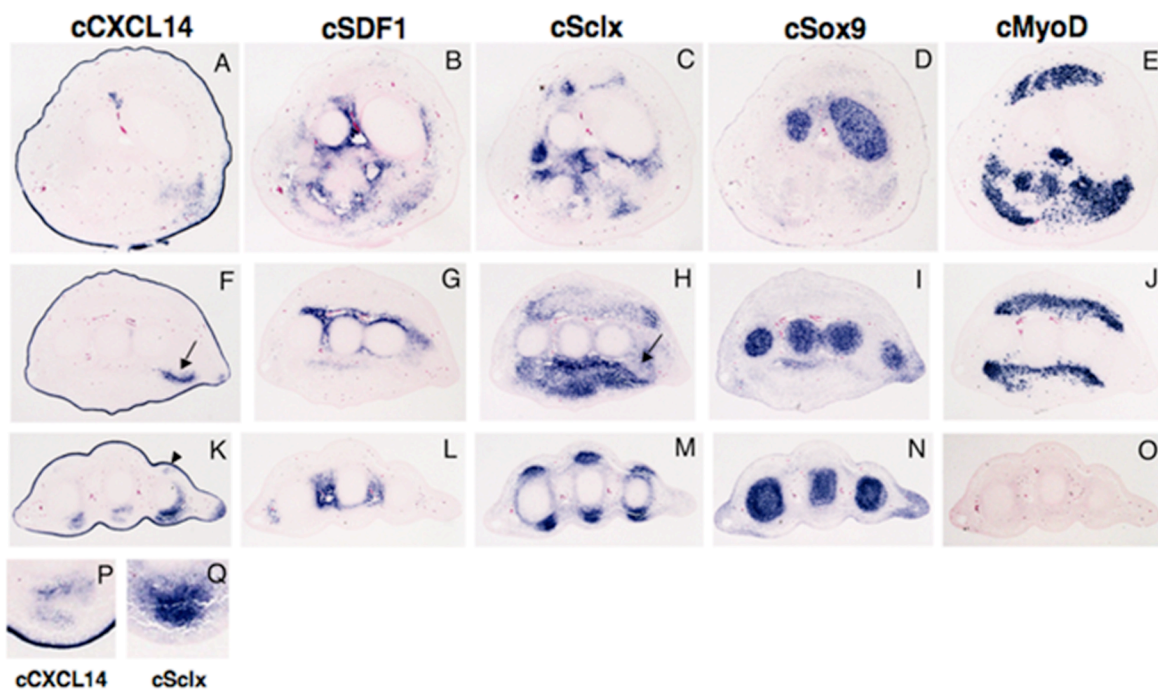


En secciones transversales de una pata de HH31 del pollo al nivel del zeugopodio se observa una expresión discreta en el mesénquima periférico que solapa parcialmente con el marcador de músculo diferenciado *MyoD* (**Fig. 37A y 37E**); No obstante, dado que la expresión de *MyoD* no es totalmente homogénea y que el estudio no está hecho con resolución celular, no se puede afirmar que haya una coexpresión de estos dos genes. En una sección al nivel de los metacarpales, *CXCL14* se expresa en una franja pequeña situada debajo del segundo metacarpal, adyacente a la expresión de *MyoD* y parcialmente solapante en su parte ventral con *Scleraxis*.

En los dígitos, al igual que en ratón, *CXCL14* se expresa alrededor de los tendones y en el tejido conectivo que los liga a las condensaciones (**Fig. 37K**). Por otro lado, *SDF1* se expresa en parte del pericondrio, con una señal intensa alrededor de los vasos (**Fig. 37L**).

- En resumen, *CXCL14* se expresa en un dominio de tejido conectivo que no solapa de forma significativa con ningún marcador de los tejidos ya conocidos de la extremidad y que se encuentra estrechamente asociado con el tejido tendinoso en el autopodio.

**Fig. 37**

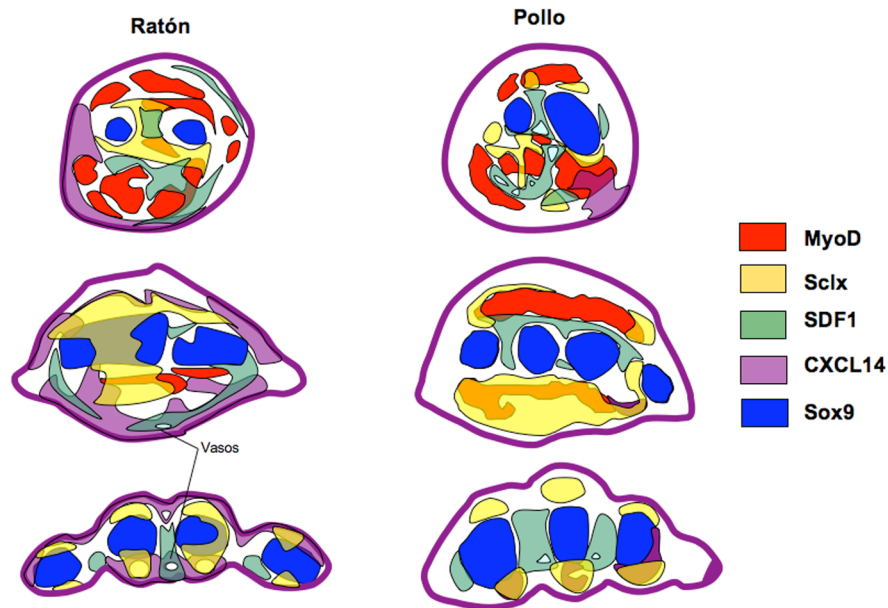


**Fig. 37\_ Patrón de expresión de *CXCL14*, *SDF1*, y marcadores específicos de tejido a lo largo del eje proximo-distal de una extremidad posterior de pollo de HH31**

Secciones consecutivas de parafina cortadas transversalmente a la altura del zeugopodio (**A-E**), de los metacarpales (**F-J**) y de los dígitos (**K-O**). Hibridación in situ con la sonda de *CXCL14* (**A, F, K**), *SDF1a* (**B, G, L**), *scleraxis* (*sclx*) (**C, H, M**), *Sox9* (**D, I, N**) y *MyoD* (**E, J, O**). **P, Q**: imagen ampliada de un tendón ventral con expresión de *CXCL14* (**P**) y *Sclx* (**Q**); Las flechas en **F** y **H** señalan la expresión complementaria de *CXCL14* y *Sclx*. La punta de flecha en **K** apunta al tendón extensor II.



**Fig. 38**



**Fig. 38\_Esquema de la expresión de los distintos marcadores específicos de tejido dentro de la extremidad de ratón y de pollo (E13,5 y HH31, respectivamente)**

La expresión de scleraxis es la menos restrictiva en cuanto al solapamiento con otros tejidos; solapa con el músculo, con el hueso, y parcialmente con el dominio de expresión de *CXCL14*, pero no con *SDF1*. En pollo, la expresión de *CXCL14* representa un subdominio dentro del tejido conectivo marcado por scleraxis; en ratón, la expresión de *CXCL14* es fundamentalmente complementaria a la de scleraxis, y además, se ve cierto solapamiento entre *SDF1* y *CXCL14* en el tejido conectivo ventral en la sección de los metacarpals; la expresión de ambas quimioquinas es especialmente intensa en el tejido que rodea a los vasos ventrales, tanto en la región de los metacarpals como en la zona de los dígitos. No obstante, hay que tener en cuenta que las secciones de los metacarpals están hechas a distintos niveles en una especie y en otra.

## **2. 1. 2. Estudio de la función de CXCL14 en la extremidad de vertebrados**

Teniendo en cuenta la redundancia de las quimioquinas, constatada por la falta de fenotipo evidente en el modelo de ratón *CXCL14*-deficiente (Meuter et al., 2007), decidimos focalizar nuestros estudios funcionales en el modelo de pollo, en el que la accesibilidad y fácil manipulación lo convertían en un modelo idóneo para realizar estudios de función y regulación.

### **2. 1. 2. 1. Función de CXCL14 en el ectodermo de la extremidad de pollo**

Cómo se ha visto anteriormente, hasta HH28, *CXCL14* se expresa con gran intensidad en todo el ectodermo de la extremidad a excepción del AER. Por la bibliografía sabemos que las interacciones ectodermo-mesénquima son esenciales para el crecimiento y el proceso de formación de patrón en la extremidad. De hecho, se ha demostrado que factores provenientes del ectodermo son necesarios para la supervivencia y proliferación de poblaciones mesenquimales subectodérmicas (Amthor et al., 1998; Schweitzer et al., 2001). Además se ha demostrado que el ectodermo es esencial para mantener la zona avascular de la extremidad (Feinberg et al., 1983).

Teniendo en cuenta estos precedentes, fijamos nuestro **objetivo** en el estudio de la quimioquina CXCL14 en el ectodermo del embrión de pollo, para lo cual formulamos las siguientes hipótesis:

**Hipótesis:**

1. CXCL14 podría ser uno de los factores ectodermicos encargados del mantenimiento de poblaciones mesénquimales subectodérmicas como precursores musculares ó precursores de tendones.
2. CXCL14 podría funcionar como factor antiangiogénico promoviendo el mantenimiento de la zona avascular de la extremidad, ya que en ensayos previos ya se ha demostrado su papel como inhibidor de angiogénesis (Shellenberger et al., 2004),

**Estrategia experimental:**

1. Estudios de perdida de función: ablación del ectodermo dorsal; electroporación de morpholinos. Estos resultados no se muestran en la tesis, pero se comentan en las figuras suplementarias y discusión, respectivamente.
2. Estudios de ganancia de función:
  - Sobreexpresión localizada en el esbozo de la extremidad con bolas de affigel cargadas con la quimioquina.
  - Electroporación de un plásmido que exprese ectopicamente el gen de la quimioquina en el mesénquima de la extremidad, y posterior análisis de la vasculatura de la extremidad.

**2. 1. 2. 1. 1. Estudios de pérdida de función**

**2. 1. 2. 1. 1. 1. Experimentos de ablación del ectodermo dorsal de la extremidad**

Para corroborar lo que estaba descrito en la bibliografía y ampliarlo a otros marcadores, decidimos realizar experimentos de ablación del ectodermo dorsal. Para ello, retiramos el ectodermo de extremidades de HH21-HH22 y tras 24h de incubación analizamos las poblaciones mesenquimales subectodérmicas mediante los siguientes marcadores:

Pax3: marcador de precursores musculares

MyoD: marcador de células musculares diferenciadas

Scleraxis: marcador de precursores de tendones y de tendones diferenciados

Cdh5: marcador de células endoteliales.

El resultado fue que *Pax3* y *Scleraxis* disminuían significativamente su expresión respecto a la extremidad control 24h después de la ablación del ectodermo dorsal (**Fig. S1A-D**) lo cual concuerda perfectamente con los experimentos realizados por Amthor y Schweitzer en los que llegaban a la misma conclusión. También observamos una bajada

drástica de la expresión de *MyoD* (**Fig. S1E, F**), un resultado aparentemente contradictorio con los ensayos de Amthor, en los que ven una subida de la expresión de este marcador después de retirar el ectodermo; no obstante, es importante subrayar que estos investigadores analizaban la expresión de *MyoD* a las 10h mientras nosotros lo hacíamos a las 24h. Por lo tanto, se puede concluir que el ectodermo está implicado no sólo en la supervivencia de poblaciones inmaduras de células musculares sino también sobre miocitos maduros. La retirada del ectodermo provoca una redistribución de la expresión de *cdh5* ó una redistribución de los vasos (**Fig. S2**), lo cual es consistente con experimentos clásicos que demuestran que el ectodermo es importante en el mantenimiento de la zona avascular (Feinberg et al., 1983)

## **2. 1. 2. 1. 1. 2. Electroporación de Morpholinos en el ectodermo para bloquear la función de la quimioquina CXCL14**

Una vez determinado el papel del ectodermo sobre las poblaciones mesenquimales subyacentes, quisimos estudiar si CXCL14 era esencial en este proceso, bloqueando la función de la proteína en esta estructura. Para ello diseñamos morfolidos, oligonucleótidos modificados sintéticamente (las bases nitrogenadas se unen a un anillo morfolido en vez de a una deoxiribosa y a un fosforodiamidato en vez de a un fosfato) capaces de unirse al RNA del gen e impedir la síntesis de la proteína. Estas moléculas pueden actuar a varios niveles, dependiendo de la secuencia a la que se unan; en el caso de unirse a secuencias consenso localizadas en el mRNA inmaduro entre un intrón y un exón, pueden impedir el proceso de splicing; por el contrario, si se unen a secuencias localizadas alrededor del ATG donde comienza la síntesis de la proteína, bloquean el proceso de transducción. En nuestro caso, diseñamos dos morfolidos para suprimir la síntesis de la CXCL14, uno que impedía el splicing y otro que impedía la traducción.

No obstante, tanto electroporando a estadíos tempranos (11HH) como a estadíos un poco posteriores (16HH) y utilizando varias de las diluciones del morfolino (100nM y 200nM) y diferentes cantidades de volumen aplicado en el flanco del embrión, no conseguimos electroporaciones suficientemente eficientes y tuvimos que desechar esta estrategia para el estudio funcional.

## **2. 1. 2. 1. 2. Experimentos de ganancia de función**

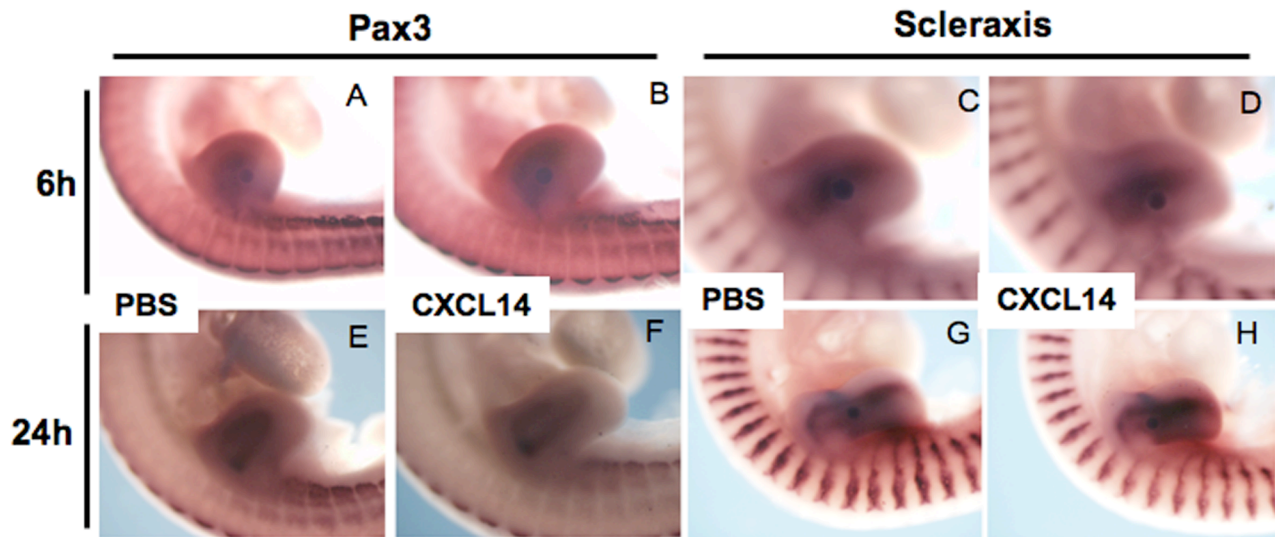
### **2. 1. 2. 1. 2. 1. Implantes con bolas de affigel cargadas con CXCL14 recombinante y análisis de marcadores específicos de poblaciones mesenquimales.**

Con el fin de investigar la función que realiza CXCL14 en el ectodermo, decidimos sobreexpresar ectopicamente CXCL14 en el mesénquima y analizar su efecto sobre distintas poblaciones mesenquimales.

El primer abordaje experimental que seguimos fue la implantación de bolas de affigel (material inerte que permite la absorción y la difusión pasiva de la proteína) cargadas con la quimioquina recombinante de ratón a 0,1 µg/µl en el seno del mesénquima dorsal de una extremidad de pollo de estadio HH20-HH22 para el posterior análisis de la expresión de *Pax3* y *Scleraxis* por Hibridación in situ. Como se puede observar en las figuras, a las 6h después de la implantación de la bola con CXCL14, no se observó ninguna modificación en la expresión de *Pax3* (n=5/0) (**Fig. 39A, B**) y *Scleraxis* (n=3/0) (**Fig. 39C, D**), ni tampoco en la señal de *Pax3* a las 24h (n=2/0) de la operación (**Fig. 39E, F**). Las hibridaciones in situ de *Scleraxis* a las 24h mostraban un halo de inhibición de la expresión alrededor de la bola, siempre que esta estuviera colocada en un dominio proximal (n=5/4); no obstante, este halo de inhibición también se observó en alguno de

los controles con una bola de PBS en la parte proximal (n=1). En cambio, en los casos en los que la bola se situaba en un dominio más distal de la extremidad, en ningún momento se observó esta inhibición (n=3/0), así como tampoco se observó alteración alguna en los controles con bola de PBS distal (n=2/0). (**Fig. 39G, H**). Estas diferencias en el eje proximo-distal, probablemente son debidas a que la expresión de *Scleraxis* en proximal a esos estadios empieza a dividirse en dos franjas y el hueco en el centro de las dos, ocupado por la bola, puede producir el efecto de halo de inhibición.

**Fig. 39**



**Fig. 39\_Hibridación in situ con las sondas de Pax3 y Scleraxis tras la implantación de bolas de affigel en el mesénquima de la extremidad del embrión de pollo.**

**A, B:** Expresión de *Pax3* tras 6h de la implantación de una bola de PBS (A) y CXCL14 a 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (B). **C, D:** Expresión de *Scleraxis* a las 6h de la implantación de una bola de PBS (C) y CXCL14 a 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (D). **E, F:** Expresión de *Pax3* tras 24h de la implantación de una bola de PBS (E) y CXCL14 (F). **G, H:** Expresión de *Scleraxis* a las 24h de la implantación de una bola de PBS (G) y CXCL14 a 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (H).

Con el objetivo de estudiar el efecto de CXCL14 sobre la vasculatura, realizamos experimentos de hibridación in situ con la sonda de la cadherina endotelial de pollo (*cdh5*) tras la implantación de bolas de affigel con 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de quimioquina. A pesar de observar ,en algunos casos, menos vasos alrededor de la bola en la parte proximal de la extremidad a las 24h de la implantación (n=4/4), esto no pudo ser corroborado con los controles por la dificultad para visualizar la expresión de *cdh5* ..

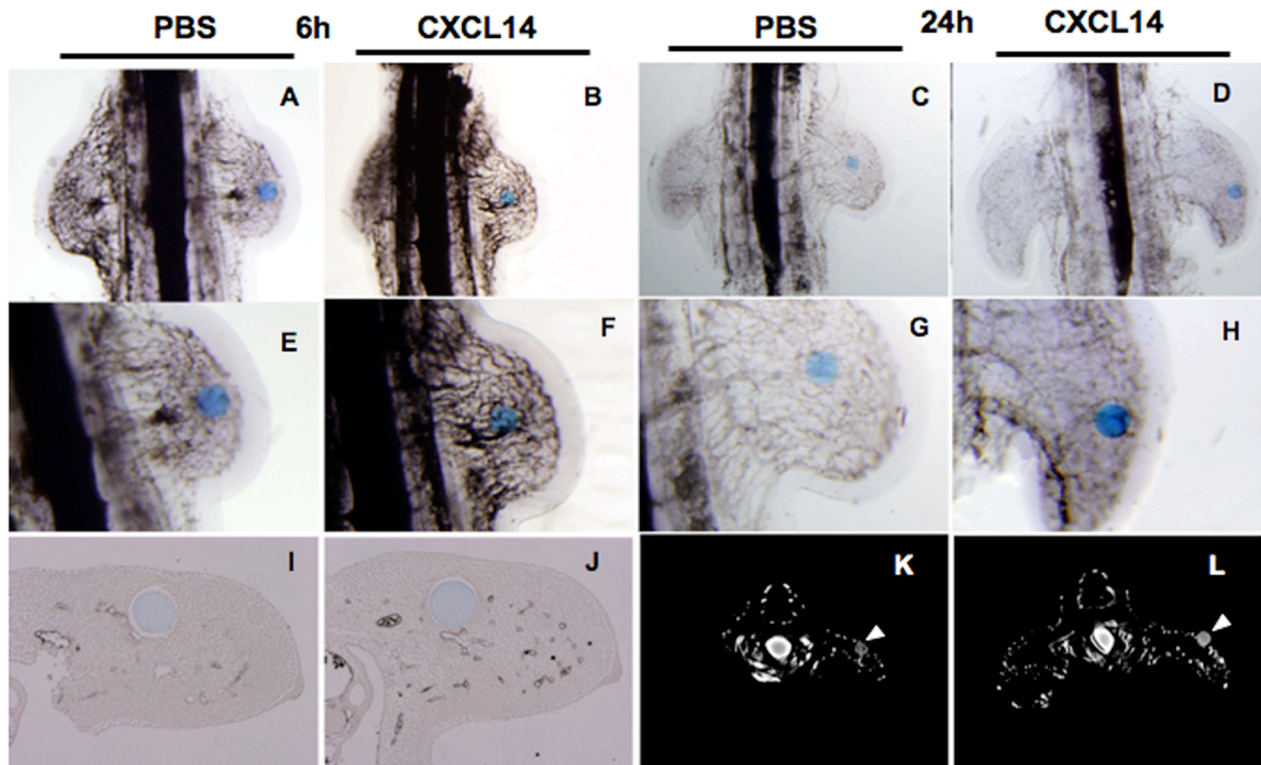
Con el fin de evitar estos problemas, escogimos el método de la inyección de tinta en la vena vitelina del embrión de pollo para la observación de la vasculatura. Tras la inyección, el corazón bombea muy rápido y distribuye la solución perfundida por todo el embrión, de manera que tanto los grandes vasos como los capilares quedan rellenos de tinta y, por tanto, visibles sin necesidad de ningún otro tipo de tinción. Después de la inyección, las extremidades se fijan, se deshidratan, y se clarean con Metil-salicilato (ver materiales y métodos).

Teniendo en cuenta que con una concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  no se había detectado ningún efecto sobre las poblaciones mesenquimales, decidimos aumentar la concentración de quimioquina a 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . A las 6h de la implantación de la bola, no se vio ningún efecto de CXCL14 sobre los vasos (n=4/0), e incluso algunos parecen estar en contacto con ella (**Fig. 40A,B e imagen magnificada en E y F, respectivamente**). A pesar de que el tratamiento con Metil-salicilato nos permitía visualizar con bastante claridad los vasos, para asegurarnos, realizamos secciones de dos de los especímenes

con bolas de affigel inyectados a las 6h de operación (uno control y otro experimental), y comprobamos la existencia de capilares muy cerca de la bola cargada con la quimioquina (**Fig. 40I, J**).

Así mismo, tampoco se observaron cambios en los vasos cercanos a la bola tras recoger los embriones a las 24h de incubación (**Fig. 40C, D e imagen magnificada en G y H, respectivamente**). En este caso, en vez de realizar secciones de parafina con el microtomo, optamos por realizar secciones virtuales de especímenes inyectados 24h después de la implantación de la bola, utilizando la técnica del OPT (Tomografía de Proyección Óptica). Éstas secciones virtuales tampoco nos mostraron ningún efecto de la quimioquina sobre la vasculatura, ya que se observó una gran proximidad de los capilares con la bola (**puntas de flecha en Fig. 40K,L y vídeo en material suplementario**)

**Fig. 40**



**Fig. 40\_Inyección de tinta después de la implantación de bolas de affigel en el mesénquima dorsal de la extremidad del pollo.**

**A, B, E, F, I, J:** 6 horas después de la implantación de la bola. **C, D, G, H, K, L:** 24h después de la implantación de la bola. **A, C:** PBS. **B, D:** 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  CXCL14. **E, F:** imágenes magnificadas de A y B, respectivamente. **G, H:** imágenes magnificadas de C y D, respectivamente. **I, J:** Secciones de parafina de A y B, respectivamente. **K, L:** Secciones virtuales de C y D, respectivamente. Las cabezas de flecha en K y L apuntan a las bolas de las secciones virtuales.

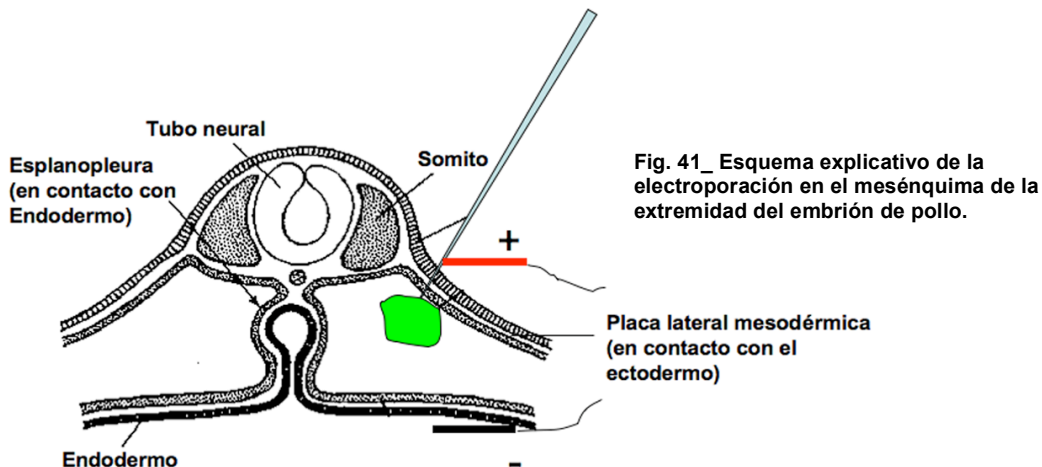
## Conclusiones de los experimentos con bolas

- Bolas de affigel cargadas con CXCL14 recombinante a  $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y colocadas en el seno del mesénquima dorsal de la extremidad no tienen ningún efecto sobre los precursores musculares y los precursores de tendones.
- Experimentos de inyección de tinta en los vasos de la extremidad tras la implantación de bolas de affigel cargadas con  $0,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de CXCL14 en el mesénquima, demuestran que la quimioquina no tiene ningún efecto sobre la vasculatura a dicha concentración.

## **2. 1. 2. 1. 2. 2. Electroporación del gen de CXCL14 en el mesénquima de la extremidad del embrión de pollo**

En paralelo a estos experimentos y con el fin de estudiar mediante otra estrategia el papel de CXCL14 sobre la vasculatura de la extremidad, decidimos sobreexpresar ectópicamente la quimioquina en el mesénquima de la misma. Para ello, electroporamos la secuencia codificante del gen CXCL14 de pollo clonado en el plásmido pCAGGS, que además de contener un promotor CMV consta de un potenciador de la transcripción (*enhancer*) del gen de la  $\beta$ -actina de pollo, lo que lo convierte en un vector idóneo para la expresión de genes en este modelo animal. Junto con el pCAGGS-CXCL14 y el pCAGGS vacío en el caso de los controles, introdujimos el pCAGGS-GFP en la mezcla de electroporación en una proporción 1/12 (pCAGGS-GFP/PCAGGS-CXCL14) para asegurarnos que las células fluorescentes también llevaran nuestro plásmido de interés y a su vez poder visualizar el nivel de electroporación en la lupa de fluorescencia. Para conseguir una buena eficiencia de electroporación en el mesénquima de la extremidad, probamos numerosas estrategias. La técnica que mejor resultado dio fue la microinyección de la mezcla de transfección en el celoma del embrión de pollo a estadio HH15-HH16, y la posterior electroporación del plásmido en el mesodermo lateral localizado encima de éste, mediante la colocación del electrodo positivo en la parte superior del embrión y el negativo en la inferior (esquema de la estrategia de electroporación en la Fig. 41)

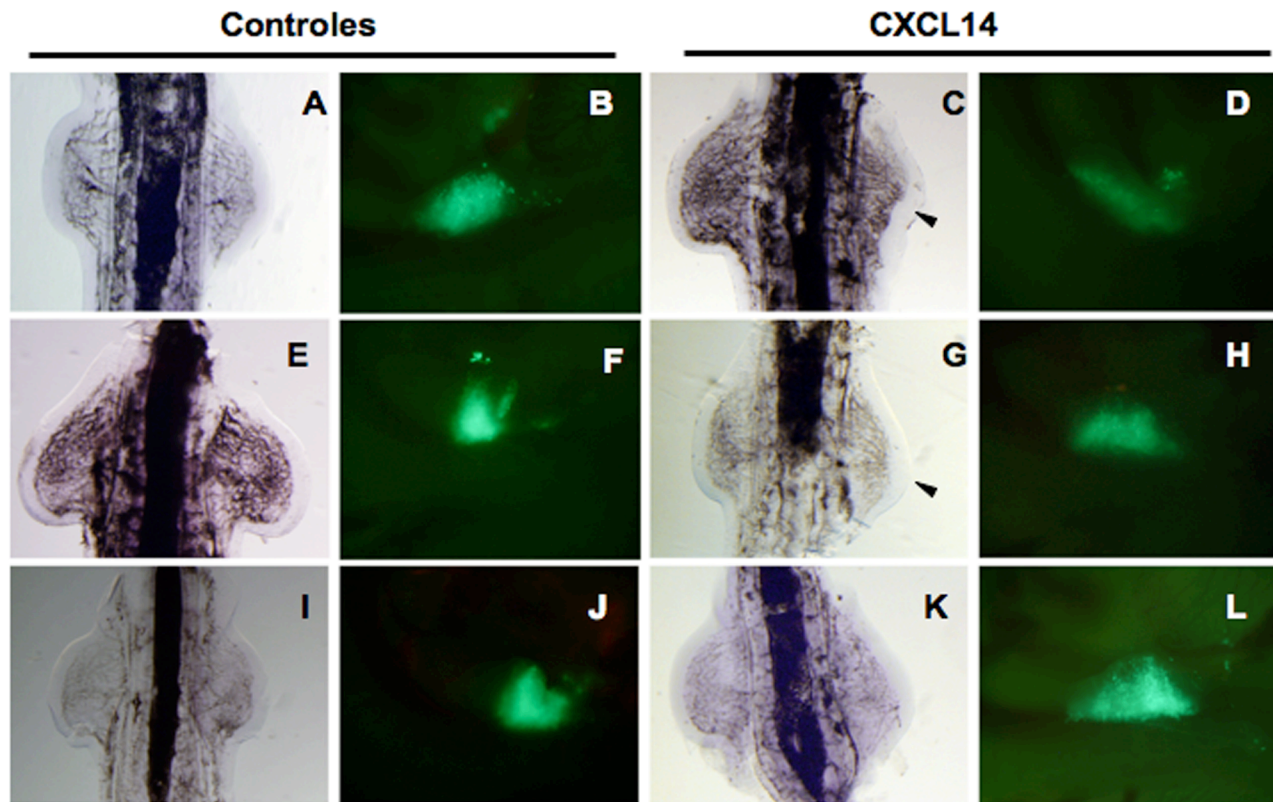
**Fig.41**





Con el objetivo de analizar el efecto de la sobreexpresión de *CXCL14* sobre la vasculatura, inyectamos tinta en la arteria vitelina como medio de contraste tras incubar los embriones electroporados durante 36h. Pasado este periodo de incubación y mediante la realización de una hibridación in situ con la sonda de *CXCL14* se pudo detectar el mRNA ectópico electroporado en las células del mesénquima de la extremidad (**Fig. S3**). Las electroporaciones en el mesénquima de la secuencia codificante del gen *CXCL14* dieron como resultado distintas truncaciones de la vasculatura, siendo bastante frecuentes las malformaciones de la vena marginal; la mayor parte de las veces estas anomalías tenían como consecuencia un aumento de la zona avascular en ciertas regiones (**puntas de flecha en Fig. 42C,G**). En otros casos, se observaron otros defectos en la vasculatura, como desviaciones de la arteria subclavia ó un plexo vascular con menor número de ramificaciones (fotos no mostradas). En las **tabla 3**, hemos resumido los distintos anomalías producidas en los vasos y su frecuencia. El resultado fue que un 78% de las extremidades electroporadas con la construcción pCAGGS-*CXCL14* presentan algún defecto en la vasculatura frente a un 69% de las extremidades electroporadas con el plásmido control. Además, en la mayoría de los casos estos defectos en el plexo vascular solían acarrear una disminución de tamaño de la extremidad electroporada (extremidad superior derecha) vs la no electroporada (extremidad superior izquierda).

**Fig. 42**



**Fig. 42. Sobreexpresión del gen de *CXCL14* en el mesénquima de la extremidad derecha del embrión de pollo.**

**A, E, I:** Extremidades anteriores perfundidas con tinta china y clareadas con metil-salicilato 36h después de la co-electroporación del *pCAGGS-GFP* y el *pCAGGS* en el mesénquima de la extremidad. **B, F, J:** niveles de GFP que muestran el grado de electroporación de A, E e I, respectivamente. **C, G, K:** Extremidades anteriores perfundidas con tinta china y clareadas con metil-salicilato 36h después de la co-electroporación del *pCAGGS-GFP* y el *pCAGGS-CXCL14*. **D, H, L:** niveles de GFP que muestran el grado de electroporación de C, G y K, respectivamente.

**Tabla. 3**

	<i>pCAGGS-CXCL14</i>	<i>pCAGGS</i>
<b>Regresión de la vena marginal</b>	<b>9/ 18</b>	<b>11 /29</b>
<b>Defectos en la vena marginal y espacio avascular constante.</b>	<b>1/ 18</b>	<b>2 / 29</b>
<b>Defectos en la vena marginal + vasos desorganizados</b>	<b>3/ 18</b>	<b>3 / 29</b>
<b>Otros defectos (vasos con menos ramificaciones, arteria subclavia desviada, etc.)</b>	<b>1/ 18</b>	<b>4 / 29</b>
<b>Ningún defecto</b>	<b>4/ 18</b>	<b>9 / 29</b>
<b>Total defectos</b>	<b>78%</b>	<b>69%</b>

La disminución de tamaño puede tener diversas causas y la interrupción del crecimiento de la vasculatura puede ser una de ellas. Las truncaciones ó malformaciones del AER también pueden acarrear una disminución de tamaño, no obstante, no encontramos ninguna malformación obvia en esta estructura. Por tanto, debido al alto porcentaje de defectos en los controles y a la dificultad de comparar el grado de afectación de la vasculatura entre controles y experimentales, decidimos comparar los tamaños de las extremidades electroporadas con el plásmido vacío ó con nuestro gen de interés, con el fin de encontrar alguna diferencia en este aspecto del fenotipo. Para ello, cogimos 15 especímenes en los que la inyección de tinta había resultado más satisfactoria.

En la **Fig. S4** se representa la relación entre el tamaño de la extremidad electroporada y la extremidad contralateral no electroporada tanto en los controles cómo en los que sobreexpresan la quimioquina. Las extremidades electroporadas con la CXCL14 son un 5% más pequeñas que los controles, a pesar de que no se observan diferencias entre las extremidades con mayores niveles de electroporación (verde) y las menos electroporadas (rojo). No obstante estos datos no son estadísticamente significativos ya que los valores de dispersión en el caso de las extremidades más electroporadas con la quimioquina son muy altos (STDEV:0,17).



## Conclusiones de los experimentos de electroporación:

- La sobreexpresión de la CXCL14 en el mesénquima de la extremidad mediante la electroporación de la construcción pCAGGS-CXCL14 provoca anomalías en la vasculatura de la extremidad que también aparecen en los controles aunque en menor número.
- La electroporación de la quimioquina produce una disminución de tamaño del esbozo de la extremidad respecto a los controles, pero este dato no es estadísticamente significativo debido a la gran dispersión de los valores respecto a la media.

## **2. 2. Estudio del factor de transcripción PRDM16 en la extremidad de vertebrados**

Otro de los genes obtenidos en el experimento de microarrays que atrajo nuestra atención es el que codifica para el factor de transcripción Prdm16. La razón de nuestro interés era que este gen se expresaba de manera muy intensa y específica en la extremidad del embrión de ratón.

Cuando comenzamos el estudio funcional de este factor de transcripción, no había ningún modelo de ratón de falta de función descrito en la literatura, pero sí encontramos en las bases de datos una línea transgénica de ratón generada por la empresa Lexicon Genetics con el gen reportero *lacZ* que codifica para la  $\beta$ -Galactosidasa insertado en el primer intrón del gen *Prdm16*; la mutación derivada de esta inserción bloquea el proceso de *splicing* generando una proteína truncada no funcional (Bjork et al., 2010). Además del gen *LacZ* fusionado al gen neo de resistencia a neomicina (BGEO), el inserto contiene un aceptor de splicing en el 5' de este gen y una secuencia de poliadenilación necesaria para la terminación de la transcripción, el gen de selección negativa de la tirosina quinasa bajo el promotor del gen de la Glucoquinasa, y secuencias de integración retrovirales LTRs (*Long Terminal repeats*) en el extremo 5' y 3' de la secuencia. Todo ello se ilustra en el siguiente esquema de la Fig. 43.

**Fig. 43**



**Fig. 43\_Esquema de la construcción insertada en el primer intrón del gen *Prdm16*.**  
LTRs = *Long Terminal Repeats*; SA = Aceptor de *splicing*; PA= *Poliadenilation site*; PGK = promotor de la glucoquinasa; TK= Gen tirosina; SD: *splicing donor*;

Con el objeto de hacer un estudio de falta de función del gen *Prdm16* pedimos ratones heterocigotos de esta línea a la empresa *Lexicon Genetics*; Estos ratones se cruzaron entre sí y posteriormente se procedió al análisis de los ratones homocigotos para la mutación del gen en cuestión.

### Objetivos:

- Estudio del patrón de expresión en el embrión de ratón
- Caracterización de la función del factor de transcripción *Prdm16* en el embrión de ratón.

### Estrategia experimental:

- Estudio del patrón de expresión mediante experimentos de hibridación in situ y tinción LacZ.
- Análisis fenotípico de “visu” de los distintos órganos y tejidos de los embriones mutantes a distintos estadios del desarrollo embrionario.
- Análisis del fenotipo esquelético mediante tinciones con Azul Alcian y Rojo Alizarin.
- Estudio del desarrollo de la extremidad en los ratones *Prdm16*<sup>-/-</sup> : papel del *Prdm16* en el desarrollo de la clavícula.

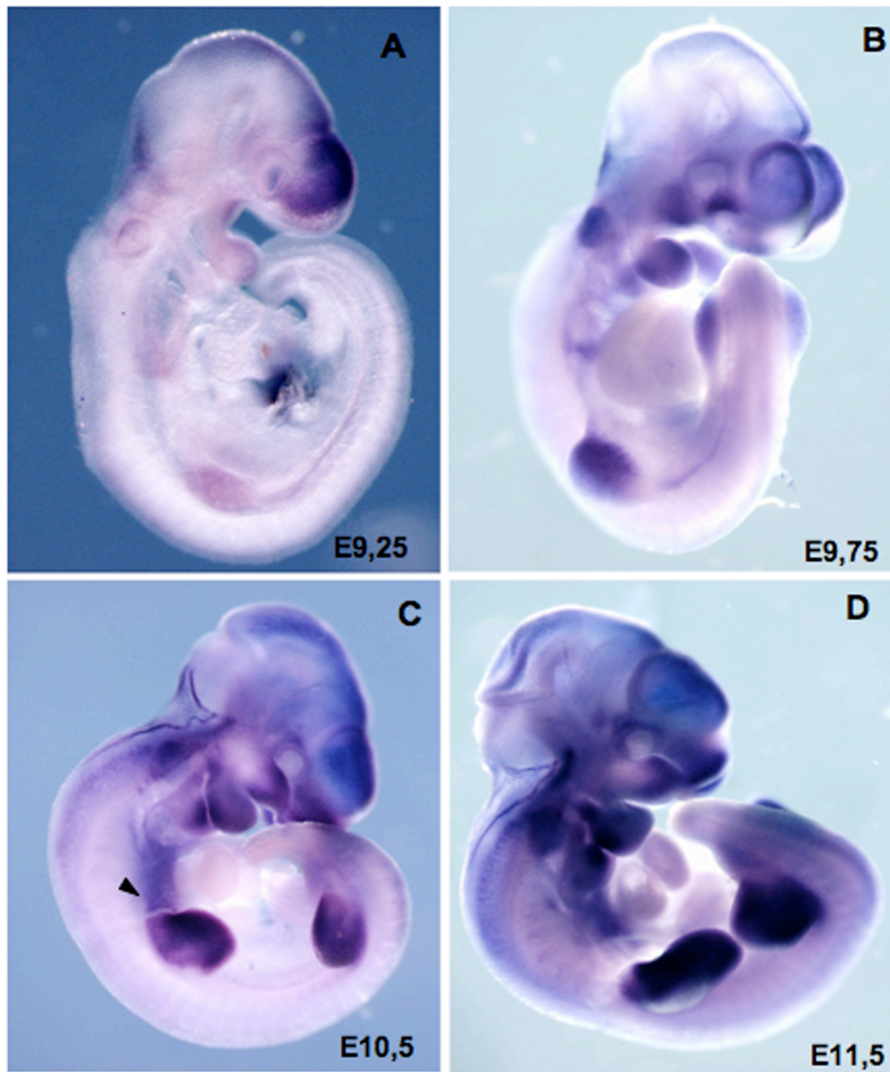
## 2. 2. 1. Estudio del patrón de expresión del gen *Prdm16*

### 2. 2. 1. 1. Estudio del patrón de expresión del gen *Prdm16* por hibridación in situ

El gen *Prdm16* se empieza a expresar tempranamente en el esbozo de la extremidad a bajos niveles, los cuales van aumentando hasta hacerse muy intensos a 10,5 dpc (**Fig. 44A, B, C**). A este estadio se observa una señal homogénea por toda la extremidad excluyendo sólo una pequeña zona proximal en la parte posterior de esta estructura. A este estadio también se observa una franja de expresión en la parte ventral del cuerpo, que va desde la parte del borde anterior de la extremidad a la parte más rostral del corazón (**cabeza de flecha en la Fig. 44C**). A E11,5, (**Fig. 44D**) la expresión del gen se mantiene muy intensa por toda la extremidad.

Además de tener una expresión significativa en la pata, el mRNA de *PRDM16* se detecta también en el mesénquima facial, mesénquima de arcos branquiales, vesícula ótica y ganglios de las raíces dorsales. También se observa señal en distintas partes del encéfalo. Como se puede ver en la **Fig. 44A**, a E9,25, el gen se expresa en romboencéfalo, mesencéfalo y telencéfalo, siendo más marcada en este último. A partir de E10,5 (**Fig. 44C**) la expresión en el telencéfalo se restringe fundamentalmente a la placoda olfatoria.

**Fig. 44**



**Fig. 44\_Patrón de expresión del gen *Prdm16* en el embrión de ratón.**

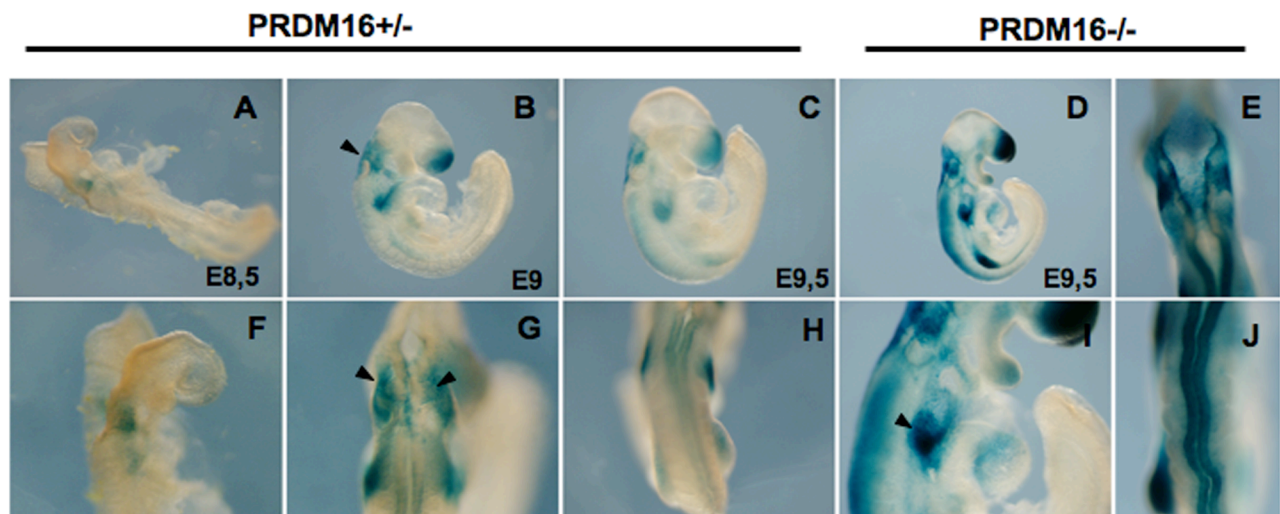
**A-D:** Hibridación in situ con la ribsonda del *Prdm16* a E9,25 (A), E9,75 (B), a E10,5 (C) y a E11,5 (D)  
La punta de flecha indica la expresión del *Prdm16* en una región ventro-lateral del cuerpo, a la altura de la extremidad anterior.

## **2. 2. 1. 2. Estudio del patrón de expresión del gen PRDM16 mediante tinción LacZ.**

Cómo una estrategia alternativa para estudiar el patrón de expresión del gen *Prdm16*, se realizó una tinción LacZ de ratones heterocigotos y homocigotos a distintos estadios del desarrollo embrionario. Este procedimiento permite estudiar el dominio de expresión de un gen de interés, mediante la visualización de la expresión del gen reportero *LacZ* controlado por el promotor del primero. En este caso, el gen reportero codifica para la enzima bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa, capaz de convertir el compuesto artificial X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) en un precipitado de color azul.

En embriones heterocigotos, a E8,5 (**Fig. 45A**), se detecta señal a ambos lados del romboencéfalo. A E9 (**Fig. 45B**), hay una fuerte tinción en el telencéfalo y mesénquima facial adyacente. También se encuentran fuertemente teñidas sendas regiones a ambos lados del romboencéfalo que parecen migrar desde el tubo neural al mesénquima colindante y que podrían constituir poblaciones de cresta neural (**puntas de flecha en Fig. 45B, G**). Resulta especialmente interesante la expresión de la tinción LacZ en una población caudal a la vesícula ótica situada en una zona ventro-lateral del cuerpo a la altura del corazón (**Fig. 45B-D y punta de flecha en Fig. 45I**); esta tinción se ve mucho más tenue en la hibridación in situ. En este estadio ya se empieza a ver cierta tinción en la placa lateral mesodérmica, en la zona prospectiva de la extremidad anterior (**Fig. 45B**). A E9,5 (**Fig. 45C**) se observa tinción en los esbozos de las extremidades. En un embrión homocigoto de 9,5 dpc (**Fig. 45D**), el patrón de expresión es el mismo que el del heterocigoto pero la señal es mucho más intensa y en algunas zonas como en el tubo neural, parece más extendida. A si mismo, en los ratones homocigotos, se ve una tinción en el corazón poco evidente en los heterocigotos. A pesar de estas diferencias en la intensidad del patrón de expresión, los homocigotos de E9,5 no mostraban ninguna anomalía fenotípica, exceptuando la forma en zig-zag del tubo neural (**Fig. 45J**).

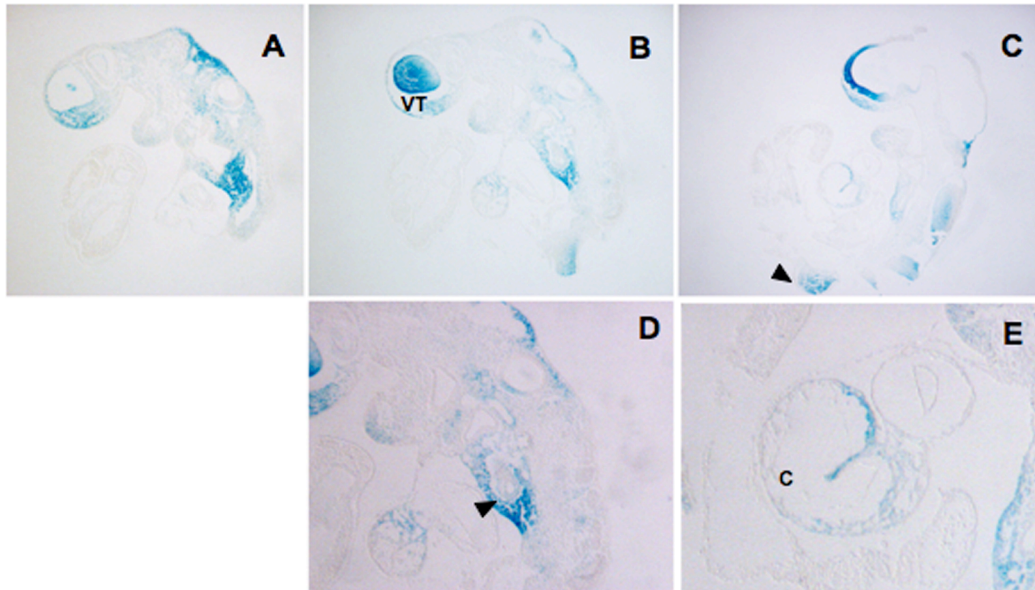
**Fig. 45**



**Fig. 45\_Patrón de expresión revelado por tinción LacZ en embriones con genotipo *PRDM16*<sup>+/−</sup> (A-C) y *PRDM16*<sup>−/−</sup> (D).** A-C: Tinción LacZ de embriones heterocigotos de E8,5 (A), E9 (B) y E9,5 (C). D: Tinción LacZ de embrión homocigoto de E9,5. F: visión magnificada de la cabeza del embrión en A. G: Visión ampliada de la región del romboencéfalo del embrión en B. H: Visión dorsal de extremidades anteriores del embrión en C. I: Imagen lateral magnificada del embrión en D. E, J: Imágenes magnificadas de región romboencefálica y tubo neural del embrión en D, respectivamente. La cabeza de flecha en I muestra una región con alta expresión en la parte caudal de los arcos branquiales. Las puntas de flecha en B y G muestran la tinción en las poblaciones celulares a ambos lados del tubo neural.

Para observar en más detalle los dominios de expresión, hicimos secciones sagitales de parafina del embrión homocigoto mostrado en la **Fig. 45D**. De esta manera, pudimos corroborar la expresión del gen en el telencéfalo y mesénquima adyacente y también en el romboencéfalo (**Fig. 46A, B, C**). También confirmamos la expresión en el miocardio ventricular del corazón (**Fig. 46E**) y en el mesénquima de la extremidad (**punta de flecha en Fig. 46C**). A la altura del corazón pero en una región más lateral observamos una fuerte expresión alrededor de una estructura tubular que probablemente corresponde a una sección del esófago (**punta de flecha en Fig. 46D**).

**Fig. 46**



**Fig. 46\_ Secciones sagitales de parafina del embrión *Prdm16*<sup>-/-</sup> mostrado en la Fig. 45D.**

**D:** Imagen ampliada de la región de los arcos branquiales. **E:** Imagen ampliada del corazón. La punta de flecha en C muestra la tinción en el mesénquima de la extremidad anterior. La punta de flecha en D muestra una sección transversal de una parte del esófago, alrededor de la cual hay una fuerte tinción. vt: vesícula telencefálica; c: corazón.

A estadios más tardíos del desarrollo, algunos de estos dominios de expresión persisten y otros desaparecen.

A E11,5 (**Fig. 47A, B**), en los embriones heterocigotos se observa una fuerte tinción por toda la extremidad, en el tubo neural, ganglios de las raíces dorsales, en los ganglios trigéminos en la base de la cabeza, telencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo; también está teñido el mesénquima de la cara y el ojo. El embrión homocigoto (**Fig. 47B**) de la misma camada mostraba los mismos dominios de expresión pero la señal era mucho más intensa. Secciones de un heterocigoto y un homocigoto a este estadio a la altura de las extremidades muestran una alta expresión en todos los tejidos mesenquimales de la extremidad, muy parecida en ambos genotipos. En estas secciones se observa la expresión en la mitad dorsal del tubo neural y la fuerte señal en los ganglios de las raíces dorsales (**Fig. 48A, B**). Nota: la hemorragia dentro del pericardio probablemente sea un artefacto de la manipulación, ya que el tejido está muy dañado después del protocolo del LacZ y de la deshidratación para cortar en parafina.

Los heterocigotos de E12,5 (**Fig. 47C**) presentaban el mismo patrón que los de E11,5 y además seguían manteniendo una fuerte expresión por toda la extremidad; los homocigotos (**Fig. 47D**), al igual que en otros estadios tenían una expresión más intensa. No se observaron grandes diferencias fenotípicas, aunque los ratones homocigotos parecían ser más largos en el eje rostro-caudal que sus hermanos heterocigotos.



**Fig. 47**

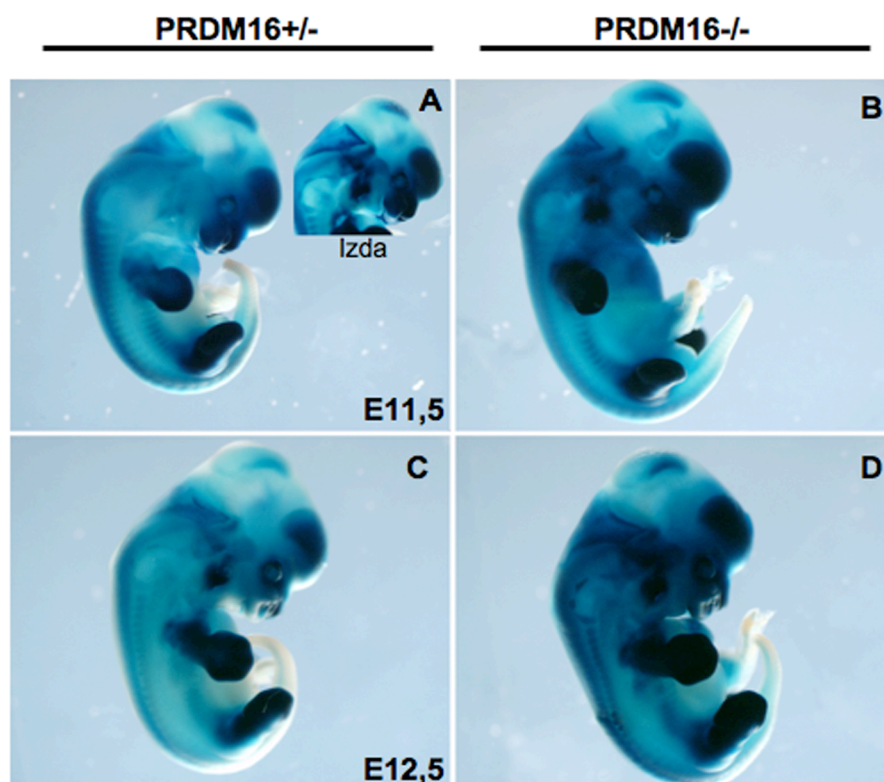


Fig. 47\_ Tinción LacZ de embriones *Prdm16*<sup>+/-</sup> (A, C) y *Prdm16*<sup>-/-</sup> (B, C) de 11,5 (A, B) y 12,5 (C, D) dpc.

**Fig. 48**

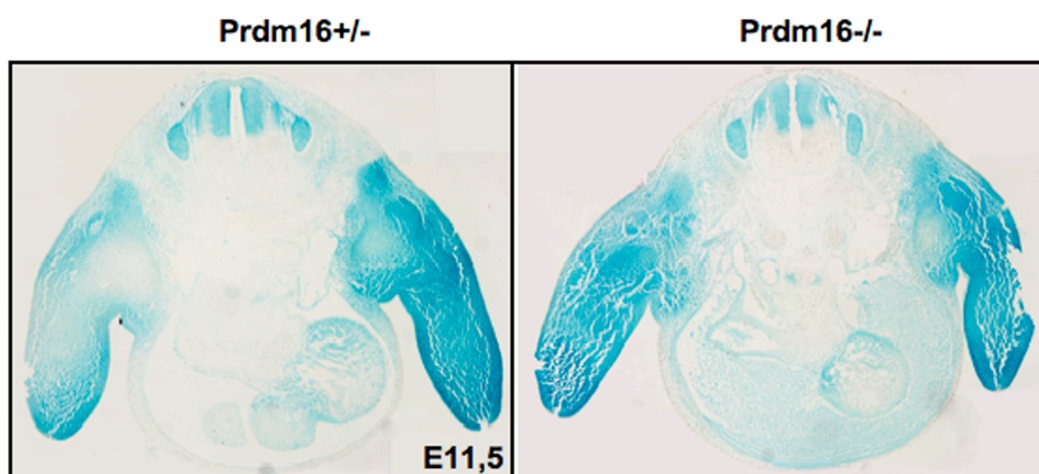


Fig. 48\_ Secciones transversales de la región de las extremidades de los embriones de la Fig 47A y B.

Teniendo en cuenta la especificidad de la expresión del gen *Prdm16* en diversas estructuras del embrión, decidimos estudiar su función en el embrión de ratón, centrando nuestra atención en su papel durante el desarrollo de la extremidad de vertebrados.

### **2. 2. 2. Análisis fenotípico de la línea mutante *Prdm16*<sup>GT</sup> (*Prdm16* gene trap)**

#### **2. 2. 2. 1. Análisis fenotípico de los órganos y los tejidos de los embriones *Prdm16*<sup>-/-</sup> a distintos estadios del desarrollo embrionario**

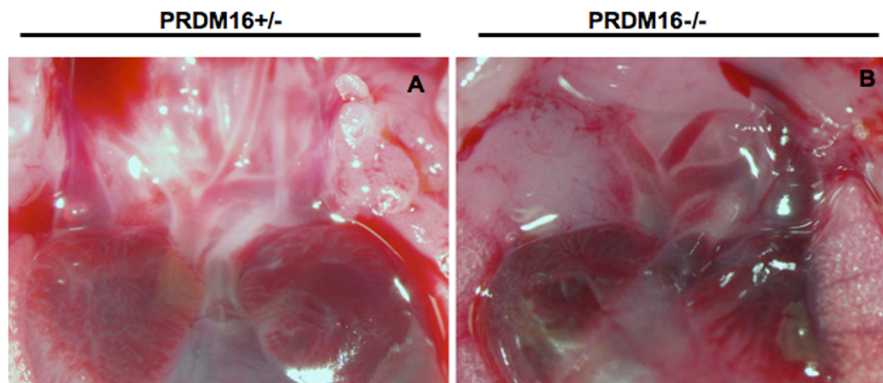
El primer paso para analizar el efecto de la mutación del gen *PRDM16* sobre el desarrollo embrionario fue cruzar ratones heterocigoto entre sí con el fin de obtener embriones mutantes homocigotos a distintos estadios.

Los embriones eran viables y no tenían defectos anatómicos muy evidentes en ningún momento del desarrollo embrionario. No obstante, los ratones mutantes morían al nacer con un aspecto cianótico además de tener un tamaño menor que sus hermanos de camada.

Tras realizar una disección preliminar de uno de los embriones mutantes (1/3), observamos que el corazón era más pequeño y existían anomalías en las ramificaciones del cayado de la aorta respecto a su hermano heterocigoto (**Fig. 49B**).

Con el objetivo de estudiar los distintos tejidos de los ratones *PRDM16*<sup>-/-</sup> hicimos una histología de hematoxilina y eosina a E16,5 y descubrimos que la piel de los mutantes estaba notablemente más arrugada, lo cual podría indicar la existencia de una hiperplasia de la piel, aunque para confirmarlo sería necesario realizar secciones más finas que faciliten el recuento del número de capas celulares.

**Fig. 49**



**Fig. 49\_ Comparación de las ramificaciones de la aorta en el corazón de un embrión *Prdm16*<sup>+/-</sup> (A) y un embrión *Prdm16*<sup>-/-</sup> (B).**

#### **2. 2. 2. 2. Análisis del fenotipo esquelético de los ratones *PRDM16*<sup>-/-</sup>**

Para analizar el fenotipo esquelético de los ratones mutantes, realizamos tinciones de cartílago con el colorante Azul-Alcian y tinciones de hueso con el colorante Rojo-Alizarin en un ratón mutante recién nacido.

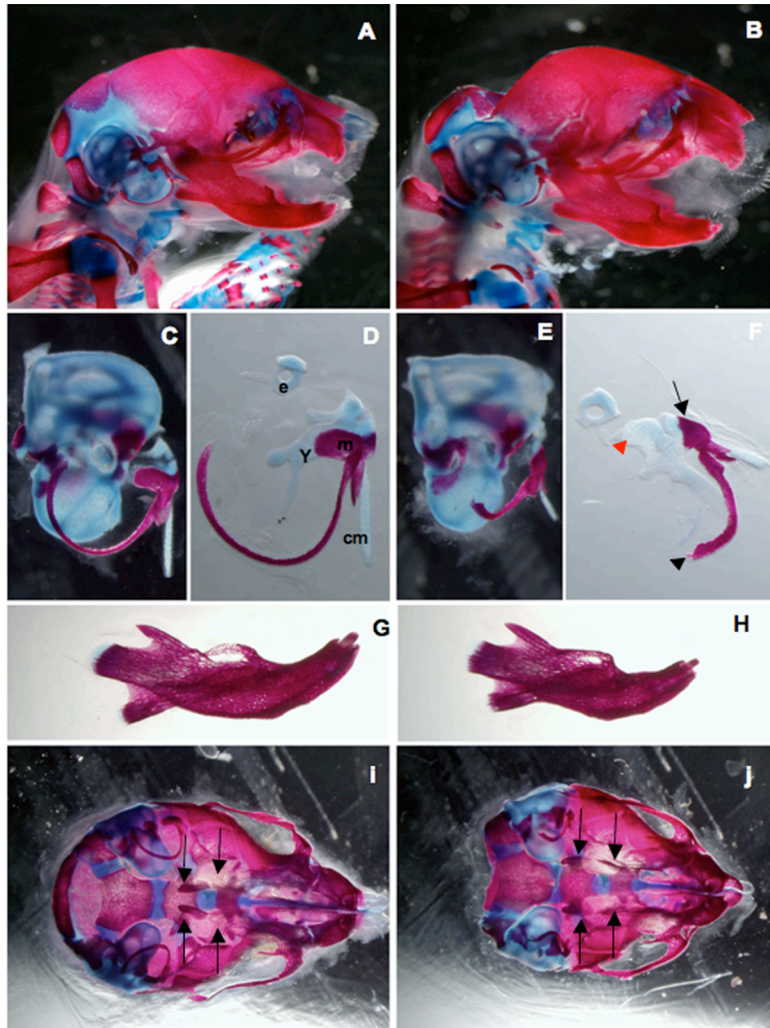
El ratón homocigoto presentaba defectos en distintos huesos craneofaciales, entre ellos, un acortamiento de la mandíbula en su eje dorso-ventral (**Fig. 50G, H**), una truncación del anillo timpánico (**cabeza de flecha negra en Fig.**

50F), y evidentes anomalías en el oído medio ,donde, el martillo también aparece truncado (**flecha en Fig. 50F**) y el yunque presenta severas malformaciones (**cabeza de flecha roja en Fig. 50F**) (**Fig. 50C-F**). Además, en una visión ventral del cráneo se pudo comprobar que los ratones homocigotos tenían el paladar secundario abierto, no existiendo separación entre la cavidad oral y los conductos respiratorios (**flechas en Fig. 50I, J**).

Dado nuestro interés en el desarrollo de las extremidades de vertebrados, pusimos especial atención en los posibles defectos del esqueleto apendicular.

El análisis de las extremidades de los *PRDM16*<sup>-/-</sup> reveló que estos poseían una truncación en la clavícula a la que le faltaba un segmento entre la parte lateral (la más cercana a la extremidad) y la parte medial (más cercana al esternón) (**Fig. 53E,K**). También tenían una pequeña muesca en la parte antero-proximal de la escápula (**Flecha en Fig. 51B**); además, la espina de la escápula desde una visión craneal es menos marcada en el ratón homocigoto (**puntas de flecha en Fig. 51C**). En el resto de los huesos de la extremidad no se observan diferencias entre el homocigoto y el heterocigoto (**Fig. 51A**), aunque la tuberosidad deltoide del húmero es ligeramente menos prominente en el mutante (**puntas de flecha en Fig. 51A**).

**Fig. 50**

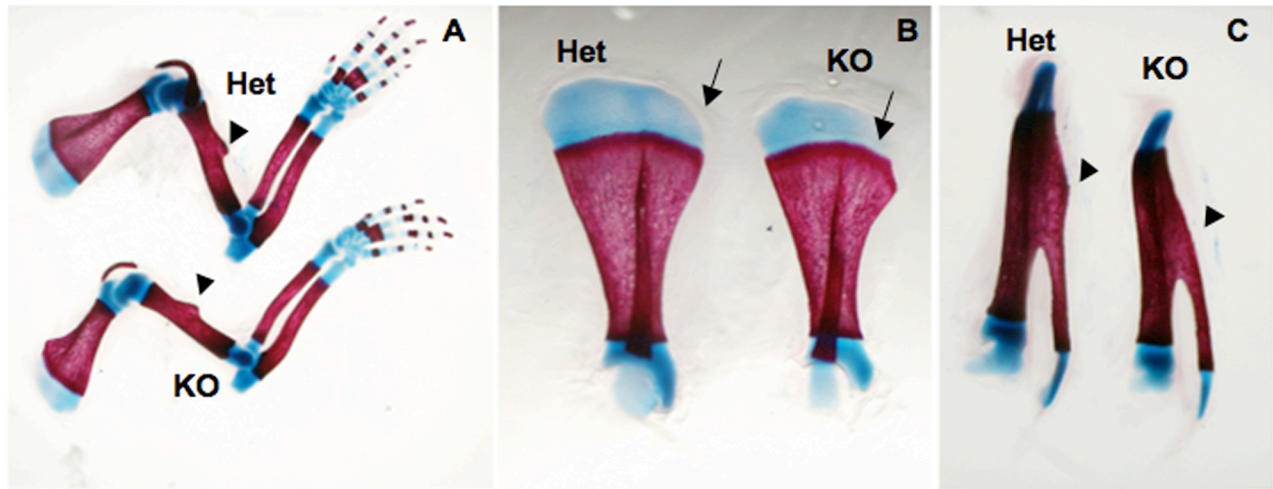


**Fig. 50\_ Tinción de hueso (Rojo Alizarin) y cartilago (Azul Alcian) de la región craneal de un ratón *Prdm16*<sup>-/-</sup> recién nacido (B, E, F, H, J) comparado con un hermano de camada *PRDM16*<sup>+/-</sup> (A, C, D, G, I).**

**A:** Esqueleto craneal completo de un ratón heterocigoto. **B:** esqueleto craneal de un ratón homocigoto. **C, E:** Tinción esquelética del oído de un ratón heterocigoto (C) y de un ratón homocigoto (E). **D, F:** esqueleto del oído medio donde se ven yunque, martillo y estribo, junto con el anillo timpánico y cartilago de Meckel en un ratón heterocigoto (D) y homocigoto (F). **G, H:** Mandíbula de un ratón *Prdm16*<sup>+/-</sup> (G) comparada con la de un ratón *Prdm16*<sup>-/-</sup> (H). **I, J:** Visión ventral del cráneo en un ratón *Prdm16*<sup>+/-</sup> (I) y en un ratón *Prdm16*<sup>-/-</sup> (J). La cabeza de flecha negra y la roja en F muestran la truncación del anillo timpánico y la malformación del yunque, respectivamente; la flecha negra muestra la truncación del martillo. Las flechas negras en J señalan los procesos palatales.



**Fig. 51**



**Fig. 51\_Tinción esquelética de la extremidades anteriores de un ratón PRDM16 +/- y PRDM16 -/-.**  
**A:** Extremidades anteriores del heterocigoto y el homocigoto sin la clavícula teñidas con Azul Alcian (cartilago) y Rojo Alizarín (hueso). **B:** comparación de la escápula del heterocigoto y homocigoto. **C:** visión craneal de las escápulas. Puntas de flecha en A apuntan a la tuberosidad deltoide del húmero. Las flechas en B destacan la muesca de la parte anterior-proximal de la escápula en el homocigoto. Las puntas de flecha en C remarcan la diferencia en el perfil de la espina de la escápula en el heterocigoto y en el homocigoto.

#### **2. 2. 2. 2. 1. Estudio de la clavícula en los ratones PRDM16-/-**

Como primer paso en el estudio de la función del factor de transcripción PRDM16 durante el desarrollo de la clavícula, decidimos estudiar el desarrollo de este hueso en los ratones mutantes en comparación con los WT. Para ello, realizamos tinciones de Azul Alcian y Rojo Alizarin en embriones de distintos estadios de desarrollo. Mediante la utilización de estas técnicas, observamos las siguientes fases de crecimiento de la clavícula:

E12,5+: se observa una condensación cartilaginosa que se tiñe con Azul Alcian y que se extiende a parte de la mitad lateral (**Fig. 52A**). (ver discusión)

E13: la clavícula ya está osificada y tiene forma de coma con el extremo medial cartilaginoso (**Fig. 52B**).

E13,5: la clavícula es más larga y más gruesa, y el tejido óseo tiene un aspecto más compacto (**Fig. 52C**)

E14,5: La clavícula adopta forma de S, haciéndose más evidente el punto de inflexión entre la parte medial y lateral (**Fig. 52D**).

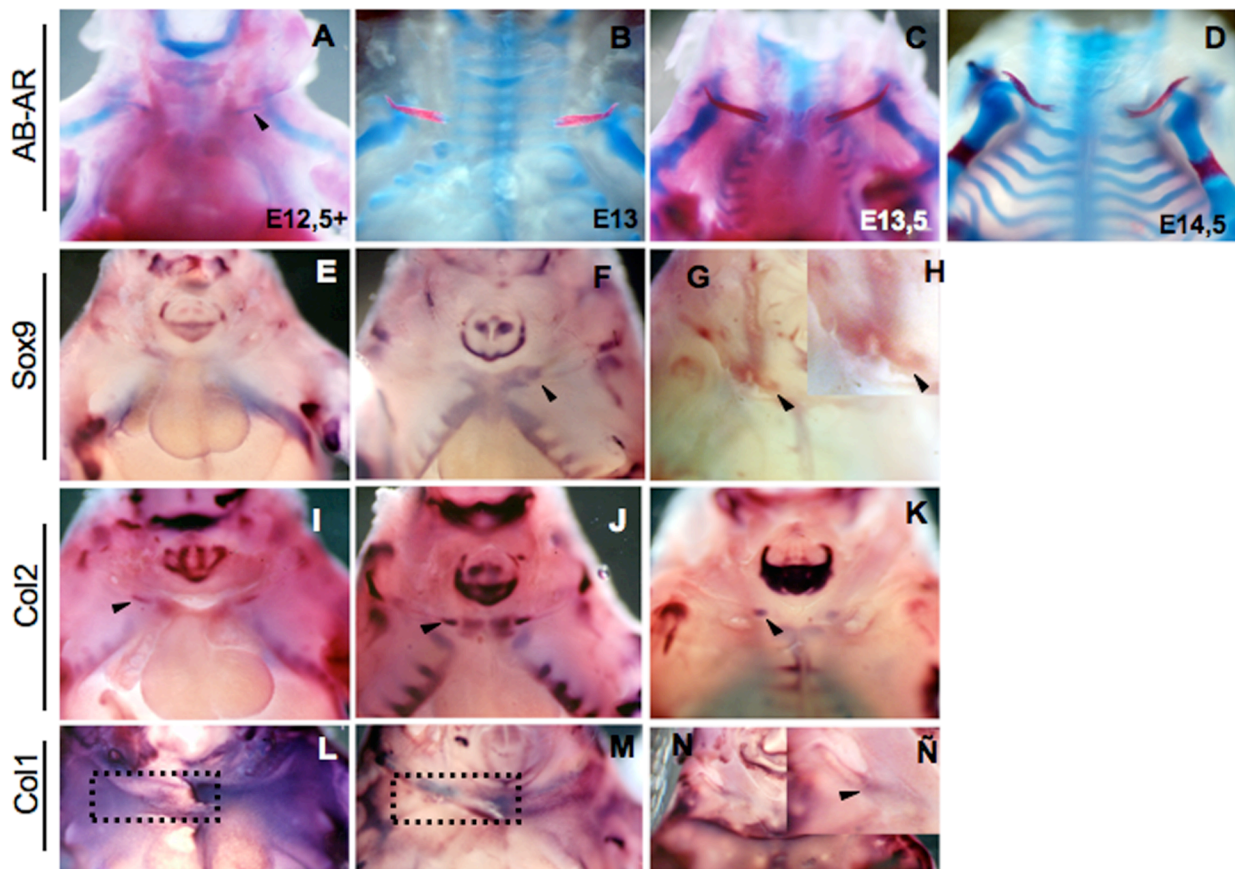
Para completar el estudio, realizamos hibridaciones *in situ* con sondas de precursores condrogénicos (*Sox9*), de condrocitos (*Col2a1*) y de osteoblastos (*Col1a1*). A E12,5+, el estadio más temprano donde se observa cartilago en la zona de la clavícula, la expresión de *Sox9* es difusa y no se puede afirmar que esté marcando la condensación mesenquimal de la clavícula (**Fig. 52E**). Por el contrario, la sonda de *Col2*, específica de condrocitos, marca claramente dos cartílagos muy cercanos a la parte más rostral del esternón, que se encuentran exactamente a la altura de la zona medial de la clavícula. Por tanto, podemos asegurar casi inequívocamente que *Col2* está marcando el cartilago medial de la clavícula (**punta de flecha en Fig. 52I**). En este estadio, la expresión de *Col1* es bastante ubicua en la zona del

ventral del “cuello”, ya que esta sonda no es específica de osteoblastos y también detecta el colágeno tipo 1 que se encuentra en el tejido conectivo. Esto provoca que sea extremadamente difícil distinguir si ya existen osteoblastos en la clavícula en esta etapa del desarrollo. Si bien hemos tratado los embriones con altas concentraciones de proteínasa K con el fin de deshacernos de la expresión ectodérmica, y hemos retirado el mesénquima superficial de la parte derecha de la región clavicular (**zona punteada en Fig. 52L**), no hemos logrado identificar señal de *Col1* en la condensación mesenquimal de la clavícula (**Fig. 52L**).

A E13, se detecta una señal intensa de *Sox9* en la parte medial de la clavícula (**punta de flecha en la Fig. 52F**; la ausencia de tinción en uno de los lados del embrión probablemente es un artefacto de la hibridación in situ). La expresión de *Col2* también se vuelve más intensa en el cartílago medial de esta estructura (**punta de flecha en Fig. 52J**), mientras que no se distingue expresión de *Col1* en la parte lateral (**zona punteada en Fig. 52M**), lo cual sería esperable si se tiene en cuenta que ya existe osificación a este estadio.

A E13,5, la señal de *Sox9* se hace mucho más débil en el cartílago medial (**puntas de flecha en Fig. 52G e imagen magnificada en H**) y la expresión de *Col2* también se hace más tenue (**Fig. 52K**). Sorprendentemente, *Col1* sí se detecta en la mitad lateral de la clavícula a E13,5, siendo su expresión más difusa pero más intensa en la parte más medial de la mitad lateral (**punta de flecha en Fig. 52Ñ**) y más definida en la zona más cercana a la escápula, donde parece localizarse en las espículas óseas más periféricas y en el periostio (**Fig. 52N e imagen magnificada en Ñ**).

**Fig. 52**



**Fig. 52\_Desarrollo de la clavícula en ratón**

**A-D:** Tinción de cartílago con Azul Alcian y de hueso con Rojo Alizarin (AB-AR) de la clavícula a E12,5+ (A), E13 (B), E13,5 (C) y E14,5 (D). **E-Ñ:** Hibridación in situ con sondas de cartílago y hueso. **E-G:** *Sox9*. **H:** amplificación de una de las clavículas de G. **I-K:** *Col2*. **L-N:** *Col1*. **Ñ:** imagen amplificada de una de las clavículas de N. Las puntas de flecha de F-K marcan la expresión en el cartílago medial de la clavícula. El área punteada en L y M marca la zona de la clavícula sin el mesénquima superficial. La punta de flecha en Ñ, marca una expresión intensa de *Col1* en la zona más medial de la parte lateral de la clavícula.

Una vez estudiada la dinámica de crecimiento de la clavícula en los embriones WT, quisimos ver que ocurría con los mutantes *Prdm16*<sup>-/-</sup>:

A E12,5+, hibridaciones in situ con la sonda de *Col2*, demostraron una ausencia de tinción en la zona prospectiva del cartílago medial de la clavícula, mientras que esta tinción sí aparece en los WT. A excepción de este estadio más temprano, en todos los demás, la comparación se realizó tras la tinción del embrión con Azul Alcian y Rojo Alizarin (**Fig. 53A, F**)

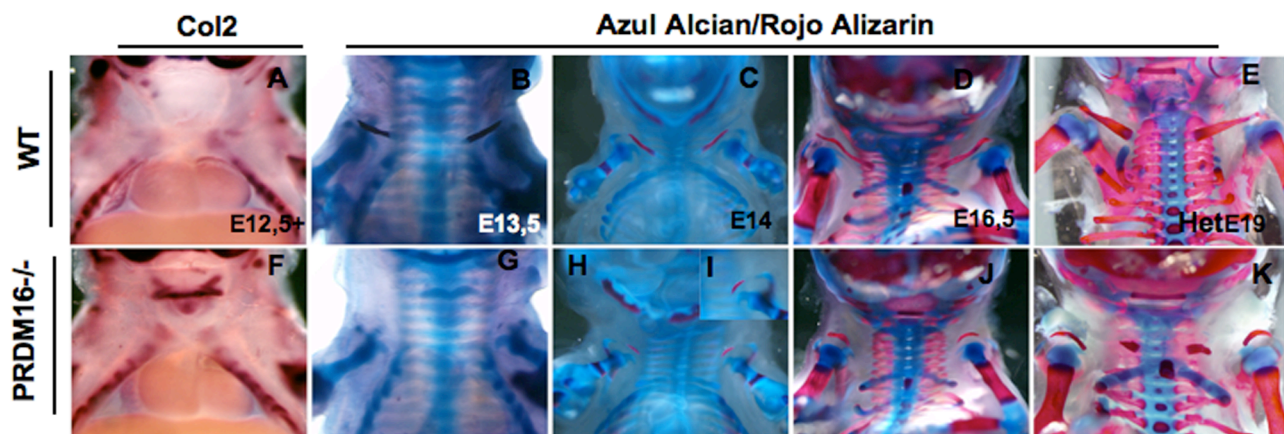
A E13,5, observamos que los *Prdm16*<sup>-/-</sup> tenían una clavícula extremadamente rudimentaria casi imperceptible a la vista que carecía totalmente de su extremo medial y el lateral estaba tremendamente reducido (**Fig. 53B, G**)

A E14, la clavícula es más grande que en los mutantes de E13,5, pero aún así le sigue faltando la parte medial con su extremo cartilaginoso y es mucho más pequeña que en el WT del mismo estadio (**Fig. 53C, H e imagen magnificada en I**)

A E16,5, el tamaño de la clavícula en los mutantes es una tercera parte del tamaño de la clavícula del WT y carece de la parte medial con osificación endocondral (**Fig. 53D, J**)

A E19-20, la clavícula del heterocigoto está totalmente formada, con un cuerpo óseo más robusto en la parte medial endocondral que en la lateral membranosa. En el homocigoto, se observa una truncación en la parte central de la clavícula.

**Fig. 53**



**Fig. 53\_** Comparación del desarrollo de la clavícula entre ratones salvajes (*Wild type*/WT) (A-E) y ratones *Prdm16*<sup>-/-</sup> (F-K)

**A, F:** Hibridación in situ con la sonda de *Col2* a E12,5+ en un ratón WT (A) y *Prdm16*<sup>-/-</sup> (F)

**B-E, G-K:** Tinción esquelética con Azul Alcian (cartílago) y Rojo Alizarin (hueso) a E13,5 (B, G), a E14 (C, H), a E16,5 (D, J) y a E19-20 (E, K). **I:** imagen ampliada de una de las clavículas en H.

### Conclusiones del estudio de la expresión y función del factor de transcripción *Prdm16*:

- Los ratones deficientes para el gen *Prdm16* presentan defectos craneofaciales, relacionados con la población de cresta neural que migra al primer arco branquial. También tienen afectado el corazón y los huesos de la cintura escapular/pectoral.
- El análisis realizado aporta nuevos datos sobre la dinámica de la condrogénesis y osteogénesis en la clavícula, y revela que esta estructura posee propiedades únicas, no observadas en ningún otro hueso del cuerpo.
- Tinciones de hueso y cartílago en los mutantes *prdm16*<sup>GT</sup> revelan que éstos carecen de la parte medial de la clavícula, la cual se forma por osificación endocondral.

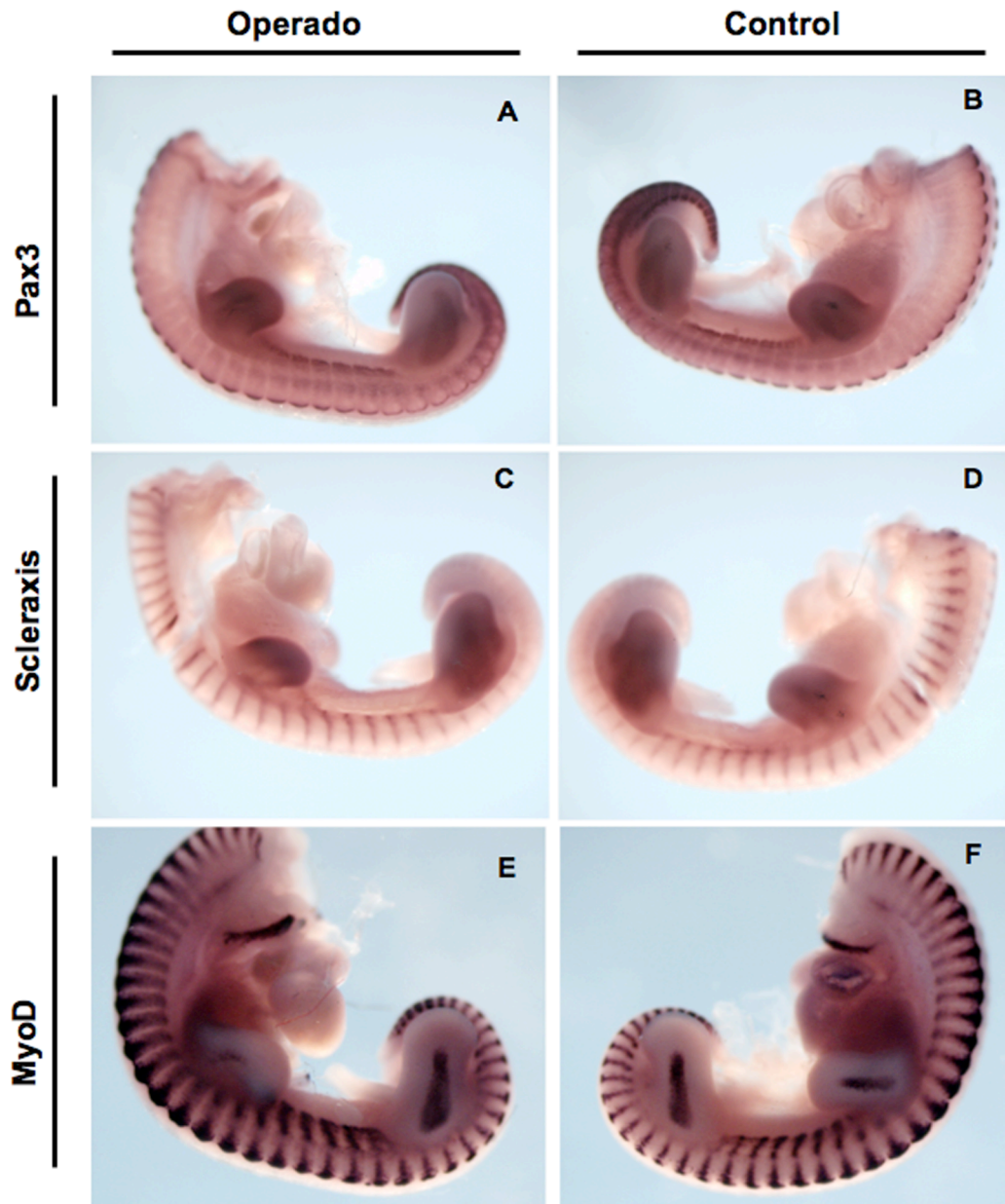


# **Figuras suplementarias**





Fig. S1



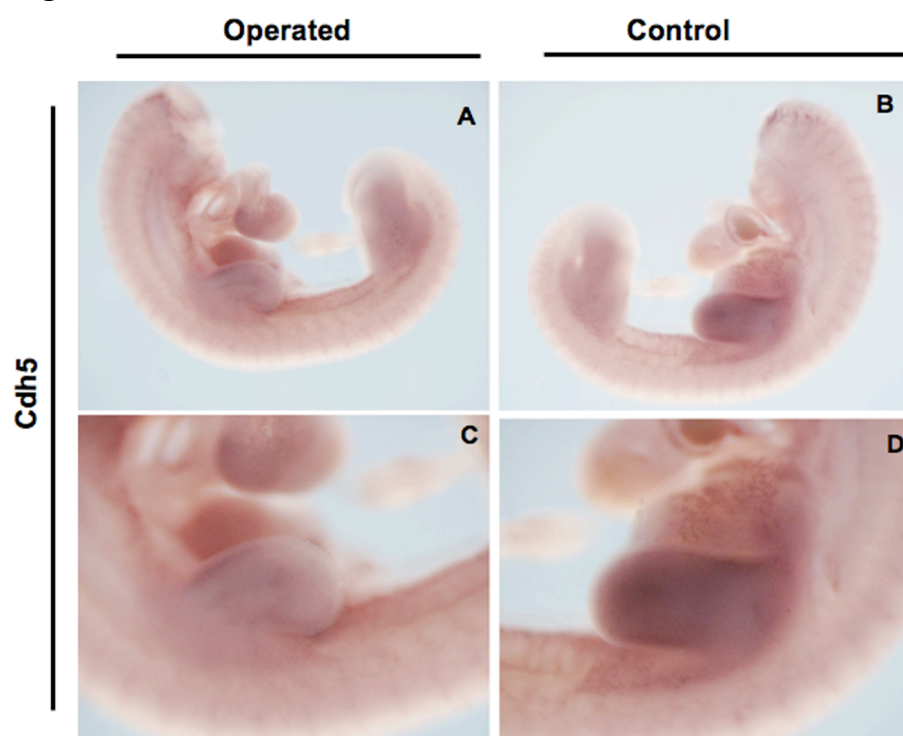
**Fig. S1\_Hibridación in situ de marcadores de distintas poblaciones mesénquimales 24h después de la ablación del ectodermo dorsal de la extremidad superior derecha .**

**A:** Patrón de expresión de *Pax3* en un embrión de HH23 tras la ablación del ectodermo en la extremidad superior derecha. **B:** Lado control del embrión donde que muestra la extremidad superior izquierda no operada. La punta de flecha en A señala la falta de expresión de *Pax3* en la parte más posterior del dominio de expresión de la extremidad.

**C:** Señal de *Scleraxis* en un embrión de HH23 tras la retirada del ectodermo en la extremidad superior derecha. **D:** Lado control del embrión donde se ve la la expresión de *Scleraxis* en la extremidad superior izquierda no operada.

**E:** Hibridación in situ de *MyoD* tras la retirada del ectodermo en la extremidad superior derecha. **F:** Expresión de *MyoD* en el lado control del embrión.

**Fig. S2**



**Fig. Suplementaria. 2\_ Hibridación in situ de Cdh5 24h después de la ablación del ectodermo dorsal en la extremidad superior derecha.**

**A:** Señal de Cdh5 en un embrión de HH23-24 tras la ablación del ectodermo en la extremidad superior derecha. **B:** Expresión de Cdh5 en el lado no operado del embrión. **C:** Imagen magnificada de A. **D:** imagen magnificada de B.



Fig. S3

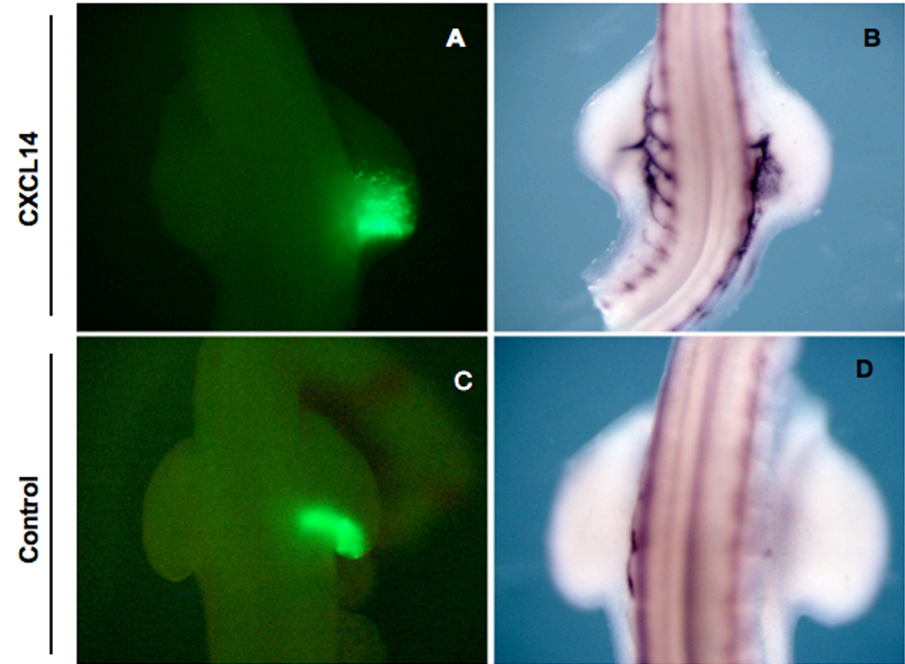
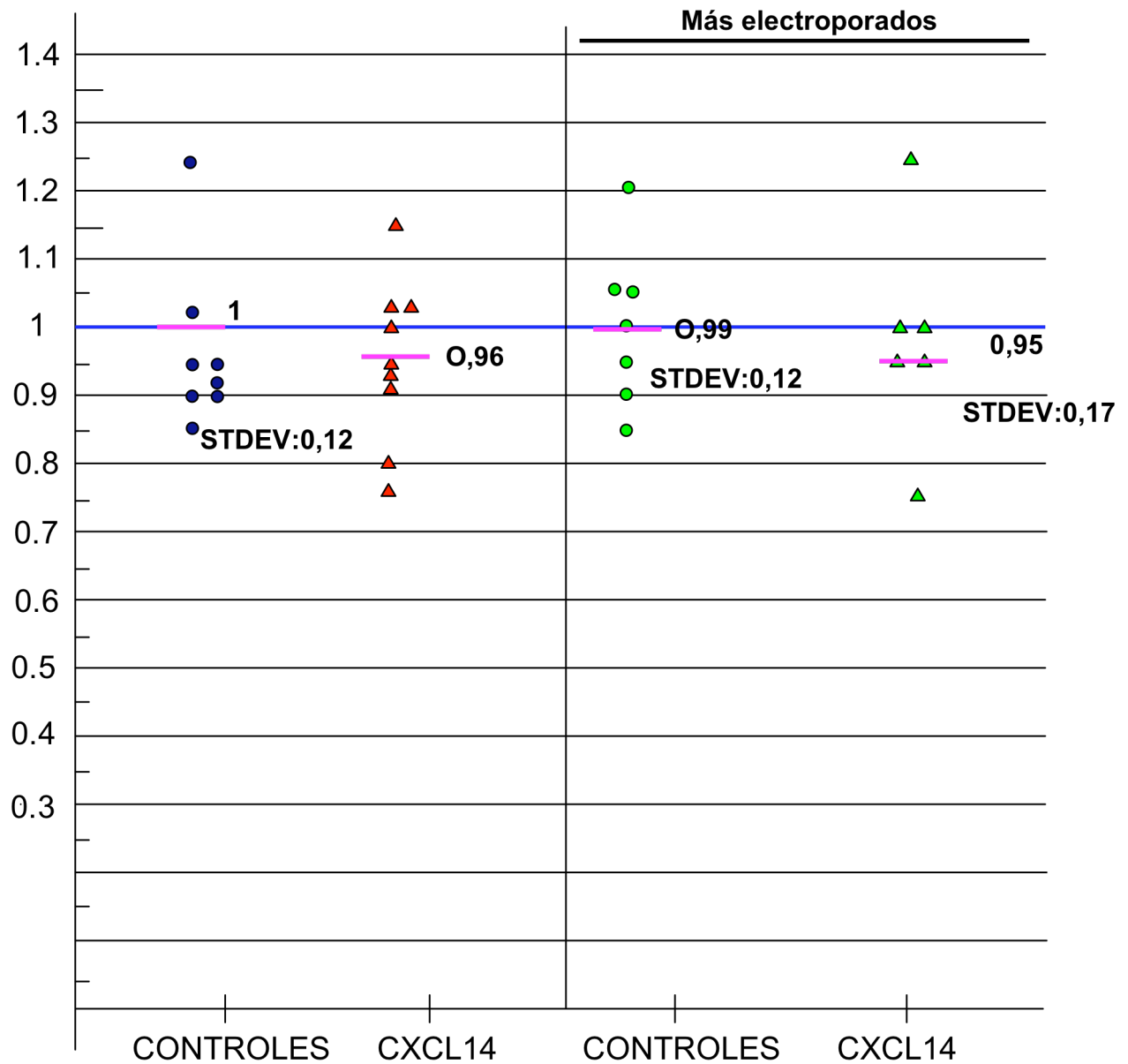


Fig. S3\_Hibridación in situ con una sonda de la secuencia codificante de CXCL14 tras la sobreexpresión de CXCL14 en el mesénquima de la extremidad. A: niveles de electroporación con el pCAGGS-CXCL14 + pCAGGS-GFP. B: distribución del mRNA de la CXCL14 en las extremidades. C: niveles de electroporación de pCAGGS + pCAGGS-GFP. D: distribución del mRNA de la CXCL14 en las extremidades.

**Fig. S4**



**Fig. S4\_Representación gráfica de la relación entre la extremidad no electroporada y la extremidad contralateral no electroporada comparando controles electroporados con el plásmido vacío (azul) con aquellos electroporados con pCAGS-CXCL14 (rojo). El verde se refiere a las extremidades con mayor intensidad de fluorescencia.**

# **Discusión**



# Discusión de los resultados

## **1. Análisis Genómico de la expresión Diferencial en el Desarrollo Proximo-Distal de la extremidad de vertebrados**

La identificación en el experimento de microarrays de numerosos genes Hox cuya expresión regionalizada en el eje P-D ya se conocía, indica un excelente enriquecimiento en genes de patrón, lo cual valida el diseño del experimento. Además, los perfiles con una expresión diferencial en los tres estadios estudiados, tanto los de genes conocidos como los desconocidos, también se corresponden con un patrón de expresión (analizado por hibridación *in situ*) restringido en la extremidad.

Atendiendo al patrón de expresión obtenido por hibridación *in situ*, podemos dividir los genes analizados en el laboratorio en varias categorías. Un subgrupo tiene una restricción más marcada dentro del eje próximo-distal, y por tanto una alta probabilidad de pertenecer a la categoría de genes de patrón; en este grupo hay genes no descritos en la literatura y otros más conocidos, aunque en ningún caso se ha estudiado su función en detalle en esta estructura.

Otros de los genes analizados, aunque presentan una señal específica y dinámica en la extremidad, no tienen una expresión restringida en el eje próximo-distal, por lo que encajarían más en la categoría de genes de diferenciación.

Así mismo, también se han encontrado genes clásicamente relacionados con la migración axonal en SNC que presentan una expresión significativa en la extremidad.

A continuación se explican las razones de nuestro interés por algunos de los genes analizados y su potencial como objeto de futuras investigaciones.

### **1. 1. Genes potencialmente implicados en formación de patrón con expresión y función desconocida en la extremidad**

**Emp1:** Dada su expresión temprana en los precursores del AER, puede tener una implicación en formación y función de este centro de señalización. La formación del AER incluye tres fases: inducción, migración de los precursores hacia la interfase dorso-ventral y compactación en un epitelio columnar ; Al ser Emp1 una proteína de membrana, una posible hipótesis podría ser que estuviera mediando alguno de los dos últimos pasos.

**Cbln1:** es un gen que codifica para una proteína precursora y luego se proteoliza dando un péptido secretable de 16 aa homólogo a las proteínas del complemento. La razón de nuestro interés en este Hexadecapéptido es que tiene un patrón de expresión muy parecido a HoxA13 lo que le sitúa como un hipotético gen de identidad distal. Su función en este contexto es totalmente desconocida.

**SerinC5:** Codifica una glicoproteína de membrana que se expresa en la parte posterior del limb y en el dominio ventral del tubo neural de una forma muy similar al morfógeno *Shh* y por tanto podría estar relacionada con la formación del patrón antero-posterior en la extremidad y guardar alguna relación funcional con SHH.

**Prdm16:** Codifica un factor de transcripción que contiene un dominio de remodelación de la cromatina y se expresa de manera específica en las extremidades, de manera que podría ser un factor importante para la unión de otros genes de patrón como los genes Hox al DNA.

## **1. 2. Genes potencialmente implicados en formación de patrón con expresión conocida y función no descrita en la extremidad**

***Nr2f1/COUP-TF1***: Su expresión ya estaba descrita en la extremidad, aunque poco exhaustivamente, en anteriores trabajos (Jonk et al., 1994). El hecho de que sea un factor inducible por ácido retinoico, que se expresa en la parte proximal de la extremidad lo convierte en un gen potencialmente interesante, ya que se ha demostrado que el ácido retinoico confiere a las células identidad proximal (Mercader et al., 2000)

***Wisp1***: Codifica la proteína *Wnt inducible signaling protein1*. La expresión de este gen ha sido recientemente descrita en la extremidad (Witte et al., 2009), y asociada con la formación de cartílago en estadios tardíos; No obstante, aunque también mencionada en la publicación de estos autores, la expresión en estadios más tempranos no ha sido bien estudiada. Sería interesante comprobar si esta expresión temprana proximal, guarda relación con la vista posteriormente en el cartílago ó es independiente de ésta, y pudiera tener otra función.

***Nrp2***: Codifica la neuropilina2, una proteína importante en la migración axonal y también en la angiogénesis y linfangiogénesis. El patrón de expresión ha sido descrito en la extremidad, aunque de manera poco detallada y solo en secciones de E10,5 (Yuan et al., 2002).

Su expresión en la extremidad se restringe al ectodermo dorsal y mesénquima inmediatamente subyacente a este hasta E10,5, a partir del cual empieza a aparecer en la parte proximal otro dominio de expresión equivalente en el ectodermo y mesénquima ventral. La correlación entre esta restricción espacial de la expresión en la extremidad y sus funciones ya descritas en el sistema nervioso y sistema vascular es todavía desconocida, aunque podría estar ejerciendo de guía axonal y vascular también en este contexto.

***RIKENcDNA9030408N13***: Codifica una proteína transmembrana y se expresa mucho más fuerte en el dominio distal a E11,5-12 que en dominios más proximales, lo que la convierte en una posible candidata para ser una proteína que medie adhesión celular en respuesta a genes de patrón.

## **1. 3. Genes potencialmente implicados en diferenciación cuya función y expresión no ha sido descrita en la extremidad**

***Itm2a***: Codifica una proteína integral de membrana que ha sido relacionada con el proceso de condrogénesis y miogénesis “in Vitro” (Tuckermann et al., 2000; Van den Plas and Merregaert, 2004). Estos datos podrían ser extrapolables a una situación “in vivo”, ya que también se expresa en el dermomiótomo, fuente de precursores musculares de la extremidad.

***Img/Lrig1***: Codifica una glicoproteína de membrana que se expresa a lo largo de todo el eje proximo-distal en sendas poblaciones subectodérmicas en la mitad ventral y dorsal de la extremidad, así como en el dermomiótomo (datos no mostrados), de donde salen los precursores musculares de distintas partes del embrión y también los precursores de las células que van a formar la dermis; dado que los ratones deficientes en esta proteína poseen displasia en la piel (Suzuki et al., 2002), ésta podría tener un papel importante en la diferenciación y estructura de la dermis y epidermis.

#### **1. 4. Genes de migración celular cuya expresión y función no han sido descritas en la extremidad**

**CXCL14:** codifica una quimioquina implicada en la migración de células dendríticas inmaduras hacia tejidos periféricos como la piel (Schaerli et al., 2005). Su patrón de expresión en un subdominio del tejido conectivo de la extremidad de ratón no ha sido descrito previamente, y tampoco su función en esta estructura.

#### **1. 5. Genes de migración celular cuya función no ha sido descrita en la extremidad**

Otros genes aquí analizados como los que codifican para las moléculas **PlexA2** y **Slitrk6**, ambas relacionadas con la migración axonal en el sistema nervioso, parecen tener un patrón de expresión similar durante la formación de la extremidad, lo cual apoyaría la hipótesis de que también promovieran la migración de células nerviosas en esta estructura. Además, las claves para el correcto desarrollo del sistema nervioso en la extremidad constituyen aún un campo poco explorado.

(Nota: Referencias bibliográficas más exhaustivas de estos genes en la parte de apéndice de resultados)

### **2. Análisis de la expresión de CXCL14 y discusión de sus posibles funciones**

#### **2. 1. Patrón de expresión**

A pesar de ser la quimioquina más antigua y conservada, junto con SDF1, dentro de esta familia de proteínas, la expresión y función de CXCL14 durante el desarrollo embrionario ha sido muy poco estudiada. En esta tesis se describe el patrón de expresión por primera vez en amniotas, utilizando como modelos el pollo y el ratón, y completando así los datos publicados en *Xenopus* y *Zebra fish* (Long et al., 2000; Park et al., 2009).

Hay que destacar la expresión de la CXCL14 en las extremidades, ectodermo y arcos branquiales en el ratón, mientras que en el pollo hay que añadir una expresión muy fuerte en el dermomiótomo de los somitos, parte ventral del tubo neural y SNC y epitelio del mesonefros. La relativamente alta conservación en la secuencia de aa entre distintas especies comparada con otras quimioquinas (95% de homología entre humano y ratón, y 54% entre la quimioquina humana y la de *zebra fish*), contrasta con una gran variación en el patrón de expresión de CXCL14 en embriogénesis a lo largo de la evolución. La única región conservada entre mamíferos (estudiada en ratón) y las demás especies mencionadas es la vesícula ótica, mientras que la expresión en el SN sólo aparece en pollo, *Xenopus* y pez zebra.

En las fases tempranas del desarrollo de la extremidad de pollo y ratón sólo está conservada la expresión ectodérmica de CXCL14, ya que la expresión mesenquimal observada en estos estadios es exclusiva del ratón.

El SDF1 es la única quimioquina además de la CXCL14 que se expresa en la extremidad, además de tener diferentes funciones en embriogénesis distintas al desarrollo y homeostasis del sistema inmune.

Debido al dinamismo y especificidad de la expresión de estas dos quimioquinas durante el desarrollo embrionario, unido a su elevado grado de conservación, hicimos una comparativa de las dos quimioquinas en secciones consecutivas en el embrión de pollo y ratón. En general, CXCL14 está asociada a tejidos ectodérmicos y SDF1 a tejidos mesodérmicos no solapantes. En el embrión de pollo, la complementariedad es mucho mayor; un ejemplo son los ganglios trigéminos que

expresan CXCL14, mientras el mesénquima adyacente expresa el SDF1; otro ejemplo relevante es la bolsa de Rathke (*Ratcke's pouch*) (parte anterior de la pituitaria) donde la expresión de ambas quimioquinas también es complementaria. En el embrión de ratón, esta complementariedad únicamente se observa en el primordio de la extremidad, donde el mRNA de la primera de CXCL14 se localiza en el ectodermo y en dos poblaciones mesenquimales subectodérmicas, mientras que el de SDF1 se expresa en el mesénquima central.

En concordancia con esto, Vasyutina y colaboradores han publicado un artículo en el que se describe la expresión de CXCR4, receptor de SDF1, en una subpoblación de células musculares justo debajo del ectodermo de la extremidad. En este trabajo demuestran que estas células son atraídas por el ligando SDF1 localizado en la región central del mesénquima (Vasyutina et al., 2005b). No obstante, las células no se separan del ectodermo a pesar de la señalización del SDF1, y por tanto, es probable que otros factores procedentes del ectodermo ó del mesénquima estén modulando la migración de estas células. Uno de estos candidatos podría ser CXCL14, ya que ésta se expresa en el ectodermo de la extremidad y podría atraer a esta población celular hacia la periferia contrarestando la función del SDF1; otra posibilidad sería que, al menos en el ratón, ésta quimioquina actuara de forma autocrina sobre las células mesenquimales subectodérmicas; sin embargo para aceptar esta hipótesis habría que realizar una doble in situ para comprobar que las células mesenquimales que expresan CXCL14 son las mismas células que expresan CXCR4. En el caso del pollo, la primera hipótesis también sería válida, ya que la señal de CXCL14 en el ectodermo es muy intensa.

El receptor CXCR4 no solo se expresa en los precursores musculares de la extremidad, sino también en los vasos de la extremidad (Yusuf et al., 2006), razón por la cual se podría hipotetizar que el SDF1/CXCR4 promoviesen la angiogénesis en el seno del mesénquima, y CXCL14 en el ectodermo inhibiese este proceso, favoreciendo la formación del espacio avascular subectodérmico.

A medida que la extremidad va creciendo, la expresión de CXCL14 en el mesénquima de la extremidad de ratón se va perfilando restringiéndose al tejido conectivo que rodea a las condensaciones pre-condrogénicas que expresan el marcador Sox9. Este patrón de expresión de CXCL14 en el tejido conectivo es diferente de todos los patrones de expresión descritos hasta la fecha en la extremidad y excluye casi totalmente los dominios de expresión de marcadores específicos de tejidos como son el músculo, el hueso y los tendones en los estadios estudiados (E13,5 en ratón y HH31 en pollo). No obstante, CXCL14 aparece íntimamente ligada al dominio de *Scleraxis* en el autopodio, llegando incluso a solaparse en la región de los metacarpianos y en las zonas de unión de los dígitos con los tendones en la extremidad de ratón. En concordancia con esto, mCXCL14 aparece desde muy temprano en las zonas del mesénquima que van a ocupar los tendones. Prueba de ello es que secciones transversales de una extremidad anterior de ratón a E12,5 (datos no mostrados en la tesis) revelan una fuerte expresión de CXCL14 en todo el ectodermo, la cual se extiende al mesénquima subyacente en las zonas prospectivas de los tendones, excluyendo las zonas interdigitales. A E13,5 esta correlación se hace muy evidente ya que el dominio de expresión de CXCL14 rodea a los blastemas de los tendones del autopodio, ocupando también el tejido tendinoso de las uniones entre falanges. A E15,5 cuando los tendones ya están diferenciados, la señal de la CXCL14 en el mesénquima ha desaparecido y queda restringida a la epidermis (datos no mostrados en la tesis).

La abrupta bajada de la expresión de la quimioquina en las etapas más tardías de la formación de los tendones, indica que CXCL14 probablemente participe en una etapa temprana de la morfogénesis de los tendones como puede ser la condensación del blastema; además, su intensa señal ectodérmica apoyaría esta hipótesis ya que se ha demostrado que las interacciones epitelio-mesénquima son esenciales durante las primeras etapas de este proceso (Hurle et al., 1989)

Aunque en pollo es menos evidente, también se observa expresión de CXCL14 en el tejido conectivo que rodea a los tendones ventrales y que solapa parcialmente con la expresión de *Scleraxis*.



En el embrión de pollo, la formación de los tendones en el autopodio va precedida de la formación de la lamina mesenquimal, formada por el desplazamiento de la capa reticular de la lamina basal provocado por la intercalación de las células mesenquimales subyacentes (Hurle et al., 1989; Ros et al., 1995). Sería interesante estudiar secciones más tempranas a HH31, para comprobar si *CXCL14* se localiza en la lamina mesenquimal. Para hacer el estudio más exhaustivo se podrían analizar en paralelo la expresión de marcadores de esta capa como la tenascina.

Por otro lado, las secciones de E13,5 mostradas en los resultados de la tesis muestran que la región de tejido conectivo que expresa *CXCL14* es diferente a la región de tejido conectivo que expresa el *SDF1* y no existe solapamiento entre ambas quimioquinas a excepción de los vasos sanguíneos del autopodio, fácilmente detectables por la tinción rosácea de las células sanguíneas con eosina. Ambas quimioquinas se expresan en el mesénquima que rodea a los vasos ventrales de la región metacarpiana y los vasos interdigitales. Sin embargo, en las secciones de pollo sólo se observa la señal del *SDF1* alrededor de los vasos, lo cual puede deberse a una diferencia interespecífica ó a una menor sensibilidad de la sonda de pollo.

La expresión de *SDF1* en el mesénquima que rodea a los vasos del autopodio en el ratón es muy interesante, ya que, a pesar de que la expresión del *CXCR4* se ha asociado a los vasos de la extremidad en estadios más tempranos (Yusuf et al., 2006), la expresión de este ligando y este receptor en la vasculatura a estadios tardíos no ha sido descrita. Ambas moléculas, junto con *CXCL14* podrían estar implicadas en el crecimiento de vasos en la extremidad, ya que las tres tienen un papel en angiogénesis en otras partes del embrión. *CXCR4* y su ligando *SDF1* juegan un papel esencial en la formación de la vasculatura intestinal y son capaces de promover angiogénesis en muchos tumores. Por el contrario, *CXCL14* tiene una función angiostática, ya que se ha comprobado su función como inhibidor de la angiogénesis "in vivo". Además, el papel antagónico de estas dos quimioquinas durante la tumorigénesis (Muller et al., 2001; Ozawa et al., 2009a), podría ser extrapolable a un contexto fisiológico como el crecimiento de la vasculatura en la extremidad, de manera que el balance entre ambas regulase de una forma dinámica este proceso.

## **2. 2. Mecanismo de Señalización de CXCL14**

Las quimioquinas son capaces de inducir procesos de migración, adhesión, proliferación y activación transcripcional de distintos genes dentro de la célula, mediante la unión de receptores GPCR capaces de activar múltiples rutas de señalización. Estos receptores poseen siete dominios transmembrana y se unen a proteínas G, de las cuales la más común es la  $G_{\alpha i}$ , proteína heterotrimérica que actúa como primer transductor de la señal y que es inhibida por la toxina pertussis. En respuesta a la unión al ligando, la subunidad alfa de la proteína G unida a GDP lo intercambia por GTP activándose y separándose del complejo de las otras dos subunidades  $\beta\gamma$ . Este complejo dimérico es capaz de activar la fosfolipasa C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) que a su vez transforma lípidos de membrana en diacil glicerol (DAG) y fosfoinositol 3 fosfato (PI3P); este último induce la salida de  $Ca^{2+}$  intracelular del retículo endoplasmático al citosol. El aumento de  $Ca^{2+}$  promueve la activación de varias enzimas como la PKC que activa las rutas de señalización de AKT y p38 las cuales disparan finalmente la expresión de determinados genes. Por otro lado, la subunidad  $\alpha i$  de la proteína G activa las rutas de PI3K, MAPK y también la ruta de Rho, tres rutas importantes para la polarización, adhesión y migración celular (Mellado et al., 2006).

Algunos de estos receptores de quimioquinas pueden funcionar como oligómeros, formando tanto parejas de homodímeros como de heterodímeros. Se sabe que los receptores pueden presentar varias conformaciones en la superficie de la membrana y para explicarlas se han descrito diferentes modelos de cómo actúa el ligando sobre el oligómero; La primera de ellas es que los dímeros son detectados independientemente de la presencia del ligando; la

segunda es que el ligando estabiliza la formación de los dímeros; y la tercera es que el dímero no se forma en ausencia de ligando.

La oligomerización de receptores de quimioquinas tiene consecuencias en la transducción de la señal, inhibiéndola ó por el contrario potenciándola dependiendo de la conformación que adquiera el receptor.

Las quimioquinas se pueden unir a uno ó varios receptores, lo cual explica su gran redundancia funcional y la dificultad para identificar la función de algunas de ellas.

CXCL14 es una de las pocas quimioquinas cuyo receptor todavía no se conoce. A pesar de ello, diversos estudios han demostrado que esta quimioquina posee propiedades quimiotácticas sobre determinadas poblaciones celulares en las que dispara una cascada de señalización capaz de inducir un aumento del calcio intracelular, y que este efecto es inhibido por la toxina pertussis (PTx) (Kurth et al., 2001).

Un estudio funcional completo de CXCL14 requeriría la identificación de su receptor, ya que esto permitiría conocer las poblaciones celulares sobre las que actúa la quimioquina durante la embriogénesis.

Por esta razón, durante la realización de esta tesis iniciamos una búsqueda de posibles receptores candidatos.

Uno de los candidatos más interesantes de entre todos los receptores GPCRs de quimioquinas era el CXCR7, receptor del que, en el momento del comienzo del proyecto de tesis, no se conocía ligando (más tarde se demostró que tanto ITAC como SDF1 podían unirse a este receptor (Balabanian et al., 2005); Además, se sabía que este receptor se expresaba en la misma subpoblación de precursores musculares que expresaban CXCR4 en la extremidad (Vasyutina et al., 2005b).

Estudios posteriores de falta de función han revelado que los ratones deficientes en el receptor CXCR7 mueren al nacer con diversos defectos en el corazón, entre los cuales se encuentran la hiperplasia embrionaria, degeneración del miocardio, fibrosis y fallo en la formación de la válvula semilunar. El fenotipo también muestra defectos en la vasculatura pulmonar, que concuerdan con la expresión de este receptor en células endoteliales y su función pro-angiogénica en algunos tumores. Curiosamente, el fenotipo valvular no se observa ni en los mutantes de SDF1 ni en los mutantes de ITAC, lo que podría indicar una redundancia funcional entre ellas ó quizás la existencia de otra quimioquina que también se una a este receptor. Para descartar una de estas dos posibilidades sería necesario realizar el doble mutante.

En el adulto, el CXCR7 se expresa en cardiomiocitos, células endoteliales de los vasos de corazón y pulmones, en el cortex cerebral y en osteocitos, aunque en estos últimos nos se sabe la función del receptor ya que los estudios de falta de función no muestran deficiencias óseas (Gerrits et al., 2008).

La expresión del CXCR7 en el embrión sólo se ha estudiado en el corazón, donde los transcritos son detectables en la microvasculatura de las válvulas y el miocardio, coincidiendo con la expresión del CXCR4. La coexpresión de estos receptores “in vivo” es interesante, ya que se ha demostrado que pueden formar heterodímeros independientes de ligando “in vitro”. Además, todas las evidencias parecen indicar que el receptor CXCR7 por si sólo es incapaz de inducir una subida de calcio intracelular después de ser estimulado con ITAC ó SDF1, de manera que es bastante probable que necesite de la cooperación de otro receptor para realizar su función (Sierro et al., 2007).

El RNA mensajero de *CXCR7* se detecta por hibridación *in situ* en una población celular del mesenquima proximal de la extremidad a E10,5 (C. García-Andrés, no publicado). Esto es coherente con la detección de este receptor en el experimento de Microarrays realizado por Vasyutina y colaboradores (Vasyutina et al., 2005) Como se ha descrito anteriormente, *CXCL14* se expresa en el ectodermo y en una población mesenquimal subectodérmica en la extremidad del embrión de ratón, de modo que, o bien de forma paracrina ó autocrina (suponiendo que la población mesenquimal sea la misma que expresa el receptor) existía la posibilidad de que estuviera interaccionando con el receptor CXCR7 en el mesénquima.

Para estudiar la posible interacción del receptor CXCR7 y la quimioquina CXCL14, llevamos a cabo ensayos de medición de calcio intracelular de células 293 transfectadas con CXCR7 y estimuladas con CXCL14 (50 y 100nM). Con un 20% de transfección, el resultado fue que ésta quimioquina no es capaz, a través de la unión al CXCR7, de activar las rutas de señalización que provocan la salida de calcio al citosol (C. García Andrés, no publicado).

Teniendo en cuenta que no todas las quimioquinas liberan calcio intracelular, y dado que muchas de ellas están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos que requieren migración celular, medimos la migración “in vitro” de células L1.2 (células pre-B de ratón) que habían sido transfectadas con el receptor CXCR7 y estimuladas con distintas concentraciones de CXCL14 (0,1, 20 y 50nM). El resultado fue que la estimulación con la CXCL14 no es capaz de promover la migración en las células transfectadas y tampoco en las no transfectadas, y por tanto, se deduce que no es capaz de activar por sí sola ni el CXCR7 ni ningún otro receptor endógeno en este proceso. Sorprendentemente, CXCL14 potencia la migración de estas células una vez estimuladas con SDF1, lo cual pone de manifiesto una posible interacción entre ambas quimioquinas y el receptor CXCR4 (receptor de SDF1) que se expresa de manera endógena en este tipo celular (ver curva de migración de SDF1 en el apartado de resultados).

Al no haberse encontrado el receptor para CXCL14, se podría especular sobre varios mecanismos de señalización que incluyeran a estas tres moléculas. Una posibilidad sería que la unión de CXCL14 al CXCR4 favoreciese un cambio conformacional en el receptor que uniese con mayor ó menor afinidad el SDF1 y provocase un cambio en la señalización intracelular que incrementase el proceso de migración. También podría ocurrir que sólo la unión previa del SDF1 permitiese la unión de CXCL14 al CXCR4. Otra posibilidad es que CXCL14 se uniera a SDF1 formando un heterodímero, y que el dímero disparara una señalización intracelular distinta al monómero; este último mecanismo no es nuevo, ya que se conocen varias quimioquinas que pueden actuar como monómeros y como dímeros, con respuestas funcionales distintas para cada una de estas formas (Nasser et al., 2009). La necesidad de que las dos quimioquinas estén presentes en el mecanismo de señalización podría explicar por qué todavía no se ha identificado un receptor para la CXCL14.

En el trabajo de Sierro y colaboradores (Sierro et al., 2007) comentado anteriormente, se demuestra que CXCR4 es capaz de formar heterodímeros con CXCR7, y, aunque CXCL14 no es capaz de señalizar únicamente a través de CXCR7, cabe hipotetizar que ambas quimioquinas podrían actuar a través de este heterodímero. Sin embargo, el ensayo de migración muestra una sinergia entre CXCL14 y SDF1 tanto en las células transfectadas con el CXCR7 como en las no transfectadas, por lo que, de ser cierta esta opción, éste último debería expresarse de forma endógena en las células L1.2. Nuestros intentos de intentar detectar la expresión del CXCR7 en dichas células han sido nulos, ya que, el anticuerpo que teníamos para la forma endógena de este receptor, resultó ser inespecífico y no permitía una detección fiable del mismo. Otros trabajos han conseguido detectar una expresión muy leve del CXCR7 en células pre-B humanas, que va aumentando con la progresiva maduración hacia linfocitos B (Infantino et al., 2006), por lo que es probable que la expresión del receptor en células pre-B de ratón sea prácticamente despreciable desde un punto de vista funcional.

Como conclusión, podemos decir que, de una manera ó de otra, estas dos quimioquinas parecen actuar sinérgicamente en la migración de las células pre-B de ratón L1.2.

Esta conclusión estaría en concordancia con un artículo publicado recientemente en el que se demuestra la cooperación de ambas quimioquinas en la migración de células dendríticas inmaduras (iDCs). En este trabajo, las células dendríticas inmaduras secretan CXCL14 y SDF1 de una forma polarizada en respuesta a la estimulación con activina A, y, como consecuencia, se produce un gradiente quimiotáctico hacia donde se dirige la migración celular (Salogni et al., 2009). No se sabe si esta cooperación podría ser extrapolable a un sistema “in vivo”, pero existen varias razones para pensar que sí; La primera es que ambas quimioquinas se expresan intensamente en varios epitelios del cuerpo como el epitelio del tubo digestivo y en la piel (Agace et al., 2000; Kurth et al., 2001; Meuter et al., 2007); La segunda es que se han descrito

varios tumores que expresan activita A junto con SDF1 y CXCL14 (revisado en Agace et al., 2000); y la tercera es que, según los datos expuestos en esta tesis, las dos quimioquinas se muestran en zonas complementarias, e incluso adyacentes en muchos casos, durante la embriogénesis (Garcia-Andres and Torres, 2010); este artículo se adjunta al final de la tesis).

## **2. 3. Funciones de CXCL14**

La proteína CXCL14 humana es una quimioquina que funciona como quimioatrayente de monocitos CD14+ sanguíneos y de células dendríticas inmaduras en condiciones homeostáticas. Debido a su marcada expresión en la piel se especula sobre su papel como promotor de la migración de células dendríticas inmaduras a la epidermis donde se convertirán en células de Langerhans presentadoras de antígeno.

A pesar de su alta homología con la proteína de ratón, el modelo de ratón deficiente en el gen que codifica para CXCL14, no presenta ninguna anomalía en la migración de las células dendríticas, y tampoco en otras poblaciones del sistema inmune (Meuter et al., 2007), aunque sí que se observa una clara variación en el peso, siendo los homocigotos bastante más ligeros que los no mutantes. Esta característica es corroborada en otro trabajo donde, además, se llega a la conclusión de que los mutantes de CXCL14 tienen menor resistencia a la insulina provocada por una dieta rica en grasas y que poseen una menor infiltración de macrófagos en el tejido adiposo blanco (Nara et al., 2007). La disminución de la resistencia a la insulina se produce fundamentalmente en el músculo esquelético y la profusión de macrófagos se produce en el tejido adiposo; si existe relación entre ambos eventos, ésta es desconocida (Nara et al., 2007).

Los mutantes de CXCL14 son viables y fértiles (con muerte postnatal ocasional en los homocigotos procedentes del cruce de heterocigotos). Por tanto parecen no tener defectos que comprometan el proceso de embriogénesis. Esta revelación contrasta con el patrón de expresión dinámico y específico en los distintos tejidos del embrión, y desde un punto de vista evolutivo sorprende que una de las quimioquinas más conservadas de esa familia de proteínas, carezca de ninguna función relevante durante el desarrollo. Una posible explicación a la ausencia de fenotipo en los mutantes es la existencia de otra u otras quimioquinas con una función redundante; no obstante, esta opción es poco probable dada su baja homología con el resto de los miembros de la familia. Por otro lado, es posible que un estudio más detallado de los mutantes nulos de CXCL14 descubra fenotipos no obvios en el futuro. Otra posibilidad es que, aunque tenga una función en el desarrollo de determinadas poblaciones celulares, ésta se vea obviada por la acción de fenómenos compensatorios a lo largo de la vida del embrión.

En esta tesis, hemos analizado el patrón de expresión de CXCL14 en vertebrados, que ha resultado ser muy dinámico y específico durante la embriogénesis y en particular durante el desarrollo de la extremidad (García-Andrés and Torres, 2010). Teniendo en cuenta la fuerte expresión de la quimioquina en el ectodermo y su conservación entre pollo y ratón, decidimos estudiar la función de CXCL14 en esta estructura.

Tal y como se había demostrado en trabajos anteriores, comprobamos que la ablación del ectodermo provoca la disminución de la expresión de marcadores como *Pax3* y *Scleraxis*, y por tanto su papel esencial en el mantenimiento de algunas poblaciones mesenquimales como los precursores de músculo y tendones.

Experimentos de ganancia de función en los que insertamos bolas con la proteína recombinante de ratón en el seno del mesénquima del esbozo de la extremidad del pollo, revelaron que esta quimioquina no es suficiente para activar ninguno de estos marcadores.

Este resultado negativo se podría explicar de distintas maneras; la primera es que la quimioquina no afecte a los precursores musculares y de tendones; la segunda que la quimioquina sea una condición necesaria pero no suficiente

para activar la expresión de estos genes. En este aspecto, es muy posible que la quimioquina pueda estar colaborando con otros factores ectodermicos como las BMPs que influyen en el mantenimiento de estas poblaciones (Amthor et al., 1998). Para averiguar la contribución específica de la CXCL14 habría que llevar a cabo una estrategia de falta de función. Con este objetivo, realizamos múltiples electroporaciones con morfolinós (datos no mostrados) que bloqueaban la función de la quimioquina en el ectodermo del embrión de pollo, pero la baja eficiencia de electroporación hizo imposible la realización de estudios funcionales. La tercera posibilidad sería que CXCL14 ejerza su función sobre las poblaciones mesenquimales a estadios más tardíos, ya que se expresa tanto en el ectodermo como en el tejido conectivo durante la diferenciación de los distintos tejidos. Su expresión en el tejido conectivo podría ser de gran interés en esta fase, ya que se sabe que su estructura y composición, así como la señalización del mismo, está directamente implicada en la formación de patrón de músculos y tendones (Hasson et al., 2010). La implantación de bolas a estadios más tardíos y el consiguiente análisis del patrón de los distintos tejidos puede ayudar a aclarar esta última posibilidad y a desvelar su posible función en el tejido conectivo. La última explicación posible sería que la quimioquina recombinante de ratón no sea intercambiable por la de pollo, a pesar de la alta homología entre ambas.

Como ya se ha comentado en la introducción, experimentos de ablación del ectodermo e implantación de trozos de ectodermo en el mesénquima, demuestran que éste es esencial para el mantenimiento de una zona avascular subectodérmica (Feinberg et al., 1983). Teniendo en cuenta que *CXCL14* se expresa en el ectodermo del pollo y se ha identificado como un posible factor antiangiogénico que puede antagonizar el crecimiento de vasos en la retina de la rata (Shellenberger et al., 2004), realizamos estudios de ganancia de función mediante la implantación de bolas con la quimioquina en el seno del mesénquima vascularizado para ver si estas ejercían algún tipo de inhibición sobre los vasos circundantes. No obstante, el resultado fue que, a pesar de la presencia de la bola, los vasos mostraban un patrón similar a los controles e incluso algunos llegaban a tocar la bola.

Además de los inconvenientes para interpretar un experimento de ganancia de función adducidos en párrafos anteriores, podría ocurrir que, si realmente esta quimioquina afectase a la angiogénesis de la extremidad, lo hiciera únicamente sobre vasos que están en activo crecimiento y no sobre los que ya están estabilizados.

Para descartar que CXCL14 inhibiese el crecimiento en un estado más primitivo del plexo vascular, colocamos bolas impregnadas con la quimioquina en la placa lateral mesodérmica a 17HH. Tras 24h de crecimiento de la extremidad, se analizó la vasculatura, que en la mayoría de los casos no permitía observar una clara inhibición de los vasos, aunque en algún caso aislado la bola parecía ejercer un bloqueo topológico para el avance de vasos hacia las partes más distales del mesénquima (datos no mostrados en la tesis).

Paralelamente a los experimentos de bolas, se realizaron electroporaciones en el mesénquima de la extremidad del pollo con un plásmido que sobreexpresaba *CXCL14*, analizándose el patrón vascular tras esta operación. Sin embargo, a pesar de la alta eficiencia conseguida en la electroporación del mesénquima, ésta resultó ser una técnica muy controvertida debido a la aparición de defectos en la vasculatura en las extremidades electroporadas con el plásmido control. El crecimiento de vasos es un proceso muy dinámico y sensible a las condiciones del medio, por lo cual la aplicación de un pulso eléctrico elevado en el campo de la extremidad, podría estar alterando las condiciones metabólicas y la expresión génica que regula la angiogénesis. Por lo tanto, para el estudio de la vasculatura sería recomendable la utilización de otras técnicas menos agresivas como la infección con retrovirus ó adenovirus.

### **3. Desarrollo de la clavícula**

#### **3. 1. Histogénesis de la clavícula**

En este trabajo hemos estudiado el desarrollo de la clavícula del ratón mediante tinción de cartílago y hueso con Azul Alcian y Rojo Alizarin, respectivamente. El estudio se ha complementado con el análisis de marcadores de condensaciones pre-condrogénicas como *Sox9* y de cartílago como *Col2a1* utilizando la técnica de la hibridación in situ en el embrión entero (*Whole mount*). también se ha intentado sin éxito la visualización de osteoblastos claviculares con la sonda de *Col1a1* con el fin de acotar el estadio en el que se inicia la osificación en esta estructura.

A pesar de que existen bastantes publicaciones en las que se intenta abordar este problema, no se ha llegado a un consenso en lo referente a su origen y tampoco a su histología en mamíferos. En este último punto, una de las principales dificultades que ha impedido la exploración detallada en cortes histológicos es su particular posición que no se limita a un solo plano.

Uno de los estudios más detallados sobre el desarrollo de la clavícula en ratón es el de Huang y colaboradores (Huang et al., 1997). En este artículo, los autores realizan hibridaciones in situ con marcadores de cartílago y hueso en cortes histológicos de la clavícula a distintos estadios, así como tinciones de hematoxilina y eosina para observar su estructura. El objetivo es, en primer lugar, estudiar el desarrollo de la clavícula en ratones salvajes (*Wild Type*) y, en segundo lugar, comparar este desarrollo con ratones mutantes que reproduce el síndrome humano denominado Cleidocranella Displasia (CCD).

Según estos investigadores, los primeros indicios de una condensación clavicular se ven a E13 y, a 13,5 se observa un aumento de esta condensación con la aparición de unas células redondeadas en su centro. A E13,5 detectan expresión de *Col2a1* y *Sox9* en la parte medial de la clavícula y *Col1a1* en la parte lateral. En el caso de los ratones con CCD no se ven ninguno de estos marcadores y la condensación es mucho más pequeña sin células redondeadas. A E14,5 se distingue ya una parte cartilaginosa medial y una parte ósea lateral separadas por una placa de crecimiento con expresión de *Colágeno X (Col X)*. En los ratones con CCD en este estadio no se observa parte medial y sólo queda una osificación lateral rudimentaria a juzgar por la presencia de *Osteopontina* (marca osteoblastos y condrocitos hipertróficos) y *Col1*. No obstante, la baja resolución de las fotos de hematoxilina y eosina que muestra el artículo hace que esto último sea muy difícil de comprobar.

La conclusión de Huang y colaboradores, basada en la expresión de *Col X* y la estructura de la placa de crecimiento similar a la de los huesos largos, es que la clavícula del ratón se forma por una combinación de osificación endocondral en la región medial y osificación membranosa en su región lateral, y que tanto una como otra están afectadas en los ratones con CCD.

A la luz de nuestros resultados, algunos puntos de estas conclusiones pueden ser cuestionables. Aquí trataré de señalar las diferencias más relevantes entre su trabajo y el realizado en nuestro laboratorio.

En primer lugar, nosotros ya somos capaces de ver osificación de la clavícula a E13 mediante tinción con Rojo Alizarin, mientras en el trabajo de Huang sólo observan una condensación, probablemente porque no han hecho marcadores en este estadio.

En segundo lugar, nuestros experimentos indican que, a E12,5+/E12,75, ya se observa tinción de Azul Alcian en la condensación de la clavícula, aunque todavía no se distingue Rojo Alizarin, y por tanto, no parece que haya hueso mineralizado a este estadio. La presencia ó no de hueso en este estadio es importante ya que el cartílago medial que luego sigue una osificación endocondral podría ser un cartílago secundario, formado a partir del periostio del hueso

membranoso y no un cartílago primario formado a partir de una condensación mesenquimal. Esto no sería discordante con el hecho de que éste forme una placa de crecimiento y lleve a cabo una osificación endocondral como en los huesos largos, ya que está descrito que algunos cartílagos secundarios se pueden comportar de esa manera (Fang and Hall, 1997). Un ejemplo es el cóndilo mandibular en el que el hueso crece por osificación endocondral a partir de un cartílago secundario, organizado en varias capas desde la superficie articular hacia el interior: capa de células fibrosas, células progenitoras del periostio, condroblastos, condrocitos y por último condrocitos hipertróficos (Fang and Hall, 1997).

En rata se ha descrito una osificación endocondral de la parte medial de la clavícula con una organización semejante a la del cóndilo mandibular; no obstante en este trabajo tampoco comprueban si el cartílago medial es un cartílago primario ó secundario (Rønning O, 1988). Por el contrario, en humanos, la osificación endocondral comienza en la adolescencia mucho después de que se forme la clavícula por osificación membranosa, por lo que el cartílago medial se formaría a partir del hueso y sería un cartílago secundario (Gardner, 1968).

El grupo de Huang y colaboradores no muestra marcadores a estos estadios tempranos y, por tanto, no puede concluir que el cartílago medial sea un cartílago primario. Para confirmar la presencia de cartílago en estadios previos a la osificación de la clavícula, observada por la tinción con Azul Alcian, realizamos experimentos de hibridación in situ en el embrión entero con sondas de *Sox9* y *Col2a1*.

Mediante este procedimiento, hemos logrado visualizar una expresión clara de *Col2a1* a E12,5-12,75 en una región cercana al esternón que probablemente corresponda al cartílago medial de la clavícula. Sin embargo, únicamente conseguimos detectar claramente expresión de *Sox9* a E13, lo cual indica que este marcador temprano de condensaciones pre-condrogénicas, aparece después de *Col2* y de forma transitoria en el cartílago de la clavícula, ó que quizás su expresión temprana es demasiado difusa para distinguirla de su expresión en otras estructuras. El inicio de la osteogénesis en la zona lateral no lo hemos podido estudiar ya que la expresión de *Col1a1* en la zona prospectiva de la clavícula a estadios tempranos (E11,5- E12,5) no se distingue debido a la intensa señal en toda la zona del cuello (este marcador también marca tejido conectivo). En futuros experimentos sería conveniente la utilización de un marcador más específico.

A pesar de las dificultades experimentales, la tinción positiva de Azul Alcian y la expresión de *Col2a1* a estadios previos a la detección de hueso mineralizado, son dos indicios claros de que el cartílago medial de la clavícula en ratón es probablemente un cartílago primario, confirmándose así las conclusiones del artículo de Huang y colaboradores. Otra posible estrategia experimental para abordar esta cuestión sería realizar estudios de linaje celular mediante marcaje genético de las células del periostio ó inyectándoles Dil, con el fin de comprobar si son el origen de los condrocitos del cartílago medial.

Es importante resaltar, que la tinción de Azul Alcian de nuestros experimentos se extiende lateralmente más de lo esperado a E12,75, lo que haría pensar que no existe una separación espacial tan clara entre el centro de osificación endocondral y el centro de osificación membranosa. Esto, unido a que *Sox9* parece expresarse más tarde que *Col2a1* y de una forma muy transitoria, indica que la condrogénesis y osteogénesis de la clavícula no se parece a la de ningún otro hueso.

Cómo conclusión, podemos decir que existen dos modelos para explicar el desarrollo de la clavícula en mamíferos: por un lado, aquella que defiende que la parte medial de la clavícula posee un cartílago secundario (Gardner, 1968; Ronning and Kantomaa, 1988) que posteriormente crece por osificación endocondral, y aquella que asume el mismo tipo de crecimiento pero a partir de un cartílago primario (Huang et al., 1997).

### **3. 2. Origen de la clavícula**

Experimentos con quimeras de pollo y codorniz realizados por Chevallier en 1976 (Chevallier A. , 1976) demuestran que la clavícula aviar (fúrcula), procede de la somatopleura.

Sin embargo, ensayos recientes de marcaje de linaje celular en ratón parecen indicar que la clavícula tiene una contribución de células de cresta neural craneal post-ótica (Matsuoka et al., 2005). Esta diferencia, junto con el hecho de que la clavícula de mamíferos y la de las aves poseen distinta osificación ha suscitado algunas dudas sobre la homología de estas estructuras, aunque hay numerosos estudios evolutivos que la apoyan. Además, otro trabajo reciente hecho en pollo, describe una población nueva de células de cresta neural que expresa el gen *mafb* y que migra desde los rombómeros 6 y 7 hasta una región medial rostral a la altura del corazón, para posteriormente migrar a zonas más caudales por una ruta ventral a los somitos. Transplantes homotípicos entre pollo y codorniz que permiten hacer estudios de linaje celular revelan que en estadios posteriores, esta población de cresta neural aparece en la parte medial de la clavícula, tanto en el tejido conectivo que la rodea como en el propio hueso (McGonnell et al., 2001). No obstante, es importante resaltar que tanto los resultados del artículo de Matsuoka como los del trabajo de McGonnell, revelan una contribución mínima de células de cresta neural a la clavícula, por lo que el origen de las células que forman la clavícula sigue siendo un tema controvertido.

A continuación se aportan datos del mutante *Prdm16* analizado en nuestro laboratorio que pueden ser relevantes en este debate.

### **3. 3. Fenotipo de los mutantes del gen PRDM16**

Uno de los proyectos abordados en esta tesis ha sido el estudio de la función del gen *Prdm16*, cuya expresión mediante tinción  $\beta$ -Galactosidasa revela una fuerte señal en el romboencéfalo y las células de cresta neural que migran a partir de él. Algunas de estas células migran al segundo y al tercer arco branquial. El primer arco branquial también tiene tinción  $\beta$ -Galactosidasa pero mucho más tenue y no tiene continuidad con las poblaciones que migra a los otros arcos branquiales. Es importante reseñar que la tinción del homocigoto y la del heterocigoto aparece en los mismos lugares del embrión, aunque se muestra con mayor intensidad en el primero.

Si se compara el patrón  $\beta$ -Galactosidasa con el trabajo de McGonnell y colaboradores realizado en embrión de pollo, encontramos ciertas similitudes, ya que en nuestro modelo también aparece una población marcada en una región lateral del embrión a la altura del corazón a E9,5; En los ensayos hechos en pollo esta población expresa el gen de cresta neural *mafb* y tras migrar a una parte medial cercana al corazón se desplaza por una ruta ventral a los somitos hasta acabar en una región anterior a las extremidades. En el LacZ de la línea *Prdm16GT* existe una población que expresa el gen, situada en una región lateral caudal a los arcos branquiales a E9,5 y, aunque no hemos realizado la tinción LacZ a E10,5, el patrón de expresión de *Prdm16* visto por hibridación in situ, muestra una señal ventral en el borde anterior de la extremidad que podría corresponder a una población similar a la que describe McGonnell y colaboradores en pollo..

El fenotipo de los neonatos mutantes homocigotos del gen *Prdm16* muestra hipoplasia y dismorfia en varios huesos de la cabeza, además de la ausencia de la parte medial/central de la clavícula; entre los huesos afectados está el anillo timpánico y el martillo que sufren sendas truncaciones, la mandíbula más corta en el eje dorso-ventral, y el paladar secundario que no se llega a fusionar en el techo de la cavidad bucal.



Todos estos huesos (a excepción de la clavícula, en su mayoría), tienen su origen en la cresta neural craneal que migra al primer arco branquial, y por tanto puede que ésta esté afectada, que este afectado el contexto molecular que marca la ruta de estas células, ó que esté alterado el proceso de diferenciación de las mismas. Esto apoyaría la hipótesis de que la clavícula puede tener contribución de cresta neural, bien directa o de manera no autónoma, aunque en el caso de Matsuoka y colaboradores se refieren a la cresta neural post-ótica (PONC). No obstante, no se puede descartar que el fenotipo de la clavícula tenga un origen totalmente distinto al de los demás huesos afectados.

Por otro lado, en el mutante *Prdm16*, la parte más ancha de la escápula (*scapular blade*) tiene una pequeña muesca y el perfil de la espina escapular es mucho menos pronunciado desde un punto de vista craneal; Estas sutiles alteraciones óseas unidas a la hipoplasia clavicular podrían deberse a la ausencia de alguno de los músculos que conectan los huesos de la cintura escapular con áreas de la cabeza y con el resto de la extremidad, ya que está descrito que el crecimiento de la clavícula tiene una cierta dependencia de fuerzas mecánicas (Hall, 1986; Rot-Nikcevic et al., 2007).

### **3. 4. Comparación del fenotipo del mutante *Prdm16* con otros genes que afectan al desarrollo de la clavícula**

Tras una búsqueda exhaustiva en la literatura, hemos recopilado (Tabla. 1 de la introducción) información sobre mutantes de genes que afectan al desarrollo de la clavícula en el ratón. No obstante, ninguno de ellos posee el mismo fenotipo que el mutante *Prdm16*, aunque sí muestran algunas características comunes.

En el caso de los mutantes de *Pbx1*, se observa una hipoplasia de los elementos más proximales del esqueleto apendicular, incluida la clavícula. Este factor de transcripción forma complejos de unión de DNA con Meis proporcionando especificidad de unión para algunos factores de transcripción como las proteínas Hox, aunque también se ha descrito que estos complejos Pbx/Meis pueden modificar la estructura de la cromatina y favorecer así la unión de otros activadores específicos de la transcripción; un ejemplo de esto se da en la unión de MyoD al promotor de miogenina, al que previamente se unen estos dos factores para hacerlo competente a la transcripción (ver previews Developmental Cell, 2004 and (Berkes et al., 2004). Recientemente, se ha descrito que Meis se une a Pbx en el promotor de *Hoxb1* de pez cebra impidiendo la entrada de histona-deacetilasas que modifican la estructura de la cromatina y bloquean la transcripción (Choe et al., 2009).

*Prdm16* posee un dominio PR homólogo al dominio SET de ciertas proteínas de *Drosophila* implicado en la remodelación de la cromatina y, por tanto al igual que Meis, podría unirse a *Pbx1* para posibilitar la transcripción de genes implicados en el desarrollo de la clavícula. Esto explicaría por qué, a pesar de expresarse en todo el mesénquima de la extremidad, *Prdm16* sólo afecta a estructuras proximales, ya que la interacción de Meis con *Pbx1* provoca la traslocación de éste último al núcleo únicamente en la parte proximal de la extremidad. En un trabajo muy reciente se demuestra la implicación de *Prdm16* en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas, función con la que también se ha relacionado a *Pbx1* y a Meis, lo cual también apoyaría la hipótesis de una posible interacción de estos tres factores de transcripción (Azcoitia et al., 2005; Ficara et al., 2008; Aguilo et al., 2011).

La falta de función de los genes de la familia *Aristalless* también presentan ciertas similitudes con el fenotipo del ratón *Prdm16*<sup>-/-</sup>. Así el doble mutante de *Alx3/Alx4* muestra, al igual que éste, defectos craneofaciales y una fuerte hipoplasia clavicular. En ambos casos, la parte más afectada de la clavícula es la parte medial (parte cercana al esternón) que se encuentra ausente tanto en el primero como en los segundos. Sin embargo, en los mutantes *Alx3/Alx4* aunque también tienen afectada la parte distal de la mandíbula y el cierre del paladar, tienen intactos los huesos del oído medio y el anillo timpánico, una diferencia importante con los mutantes *PRDM16*.

*Alx3* y *Alx4* poseen funciones redundantes en el desarrollo de la clavícula, ya que los mutantes individuales no impiden la formación de esta estructura. También *Cart1*, otro gen homólogo a *Aristalles*, parece cooperar con ellos en la formación de la clavícula ya que el doble mutante *Alx4/Cart1* tiene una hipoplasia mayor en este hueso que el doble mutante *Alx3/Alx4*, de manera que *Cart1* parece tener un papel más importante que *Alx3* en este contexto. Si además de interrumpir la función de los genes *Alx3* y *Cart1*, prescindimos del gen *Tbx15* se produce agénesis clavicular. En estos mutantes también se ha observado hipoplasia en la escápula lo cual concuerda con la bajada de expresión del gen *Pax1* en la parte anterior del esbozo de la extremidad; este gen marca la condensación de la escápula y la articulación acromioclavicular. No se sabe con estos datos si los genes de la familia *aristalles* también afectarían a la condensación de la clavícula al igual que hacen con la escápula. (Beverdam et al., 2001; Kuijper et al., 2005). La expresión *Pax1* en la parte anterior del mesénquima de la extremidad es coherente con estudios de linaje que demuestran que el mesénquima anterior da lugar a las estructuras más proximales (Vargesson et al., 1997). A pesar de esto, no se conoce ningún marcador de la condensación de la clavícula en estadios tempranos.

Por lo tanto, se puede concluir que estos cuatro genes (*Alx3*, *Alx4*, *Cart1* y *Tbx15*) contribuyen al mismo proceso durante la formación de la clavícula, aunque no se conoce la fase del desarrollo de este hueso que estaría afectada en los mutantes.

*Tbx5*, es el único gen implicado en la inducción de la extremidad, sin el cual no se desarrolla ningún elemento apendicular incluida la clavícula. Éste se expresa en la placa lateral mesodérmica, en la zona prospectiva de la extremidad anterior, y por tanto, podría ser un buen candidato que iniciase la formación de la condensación mesenquimal de la clavícula. Existen varios tipos de mutantes condicionales que anulan la función de *Tbx5* en el dominio de expresión de *Prx1* (gen que se expresa desde muy temprano en todo el mesénquima de la extremidad). El primero que se realizó era una línea *Tbx5<sup>lox/lox</sup>;Prx1 Cre* en la que la recombinasa Cre induce la recombinación en el locus de *Tbx5*, anulando así la función del gen en todas las células que expresen *Prx1*. En este caso el fenotipo era una desaparición total de la extremidad, incluida la clavícula (Rallis et al., 2003). Posteriormente se hizo una modificación de esta línea que consistía en introducir una recombinasa Cre inducible por tamoxifeno que permitía un control temporal de la interrupción del gen. De esta manera, la recombinación en el total de las células de la extremidad se conseguía en un estadio posterior a la inducción de la extremidad (E9,5). En estos mutantes el AER y la ZPA se forman correctamente pero el esbozo de la extremidad es más fino en el eje AP debido a una reducción del mesénquima anterior. Además, la ausencia de *Tbx5* también provoca la disminución de *Sal14*, factor de transcripción cuya expresión se restringe a esta parte del mesénquima. Este fenotipo está en concordancia con la hipoplasia de algunos elementos esqueléticos proximales en estadios más tardíos como la escápula, que presenta un agujero en su parte más ancha (Hasson et al., 2007).

La hipoplasia escapular también se observa en los mutantes de *Tbx15*, *Alx4* y *Cart1*, que, como ya hemos mencionado anteriormente, están implicados en la formación de la clavícula. Teniendo en cuenta que estos genes se expresan más tarde que *Tbx5* en la placa lateral mesodérmica podrían estar por debajo de este gen en la cadena molecular que regula el desarrollo de este hueso.

El hecho de que el mutante condicional de *Tbx5* regulado por tamoxifeno no tenga afectada la clavícula, indica que el papel de *Tbx5* en el desarrollo de esta estructura se realiza antes o en el momento de la inducción de la extremidad.

El mutante de *Prdm16* posee una truncación severa de la clavícula, y también una ligera hipoplasia en la escápula parecida a la del mutante de *Cart1* y los dobles mutantes *Cart1/Alx4* y *Cart1/Alx3*. No obstante, el *Prdm16* se expresa antes de la inducción de la extremidad en la placa lateral mesodérmica, al igual que el *Tbx5*, mientras que los demás se inducen más tarde, con lo que podría estar por encima de estos genes en la jerarquía molecular que controla la formación de la clavícula.

Dada la coincidencia espacio-temporal del patrón de expresión de *Tbx5* y *Prdm16* en el campo de la extremidad, sería interesante estudiar si existe algún tipo de conexión entre estos dos genes.

Existen otros mutantes individuales que suprimen ó afectan a la formación de la clavícula. Un ejemplo son los mutantes del gen *Runx2*, cuya mutación en heterocigosis es la causante del síndrome humano denominado Cleidocraneal displasia (CCD) en humanos. A pesar de que se han descrito ciertos casos de agénesis total de la clavícula ó desaparición de la parte medial, en la mayoría de los individuos afectados la parte más afectada es la parte lateral que conecta con el acromion, que, en individuos que tienen la patología, presenta una osificación rudimentaria; en algunos casos no muy numerosos falta un fragmento de clavícula entre la parte lateral y la parte medial, lo cual también se observa en los ratones neonatos deficientes en el factor de transcripción *Prdm16*. El modelo de ratón que reproduce este síndrome también posee malformación de la clavícula, aunque el resto del fenotipo es diferente al del *Prdm16*.

El fenotipo de la CCD afecta a huesos craneales como los huesos parietales, mientras que el *PRDM16*<sup>-/-</sup> no presenta un fenotipo aparente en esta parte de la cabeza. A pesar de que ambos genes afectan a distintos huesos craneofaciales no podemos descartar que no tengan funciones parcialmente solapantes ó que se encuentren en la misma ruta de señalización durante la osteogénesis endocondral en algunos huesos como la clavícula.

Otro de los genes con fenotipos parecidos pero no iguales al mutante *Prdm16* es el mutante del gen *AP-2*, que codifica para un factor de transcripción inducible por ácido retinoico. Los ratones que carecen de este gen poseen agénesis de la clavícula, apertura de la pared abdominal y algunos defectos craneofaciales ligados a defectos en poblaciones de cresta neural; entre ellos se encuentra la ausencia de huesos del oído medio y el anillo timpánico, lo cual es interesante ya que es el único gen descrito con anomalías en la clavícula y anillo timpánico al igual que el *PRDM16*. Además el ácido retinoico es importante para la formación de los elementos proximales de la extremidad (Mercader et al., 2000). Sin embargo, estos mutantes, tampoco forman el esternón, con lo cual no se sabe si el fenotipo de la clavícula es un efecto primario ó secundario de la mutación de este gen.



# **Conclusiones**



# Conclusiones

- El análisis transcriptómico de la población de precursores de la extremidad a distintos estadios de su desarrollo proximodistal ha permitido el aislamiento de un elevado número de genes de formación de patrón implicados en el desarrollo de la extremidad de vertebrados, como certifica el enriquecimiento en genes homeobox, clásicamente relacionados con este proceso. Además, de los 30 genes analizados experimentalmente, un 70% tenían una expresión significativa en la extremidad, y un 56% una expresión restringida en esta estructura. Para al menos 8 de los genes estudiados, no había sido descrita su expresión y función en la extremidad.
- La quimioquina CXCL14 tiene una expresión altamente específica y dinámica a lo largo del desarrollo de la extremidad de ratón y de pollo. En el primero, la distribución del mRNA que codifica esta proteína marca un dominio mesenquimal totalmente nuevo correspondiente a una subpoblación celular del tejido conectivo no estudiada previamente, que también aparece en pollo a estadios tardíos. En ambas especies esta quimioquina posee una fuerte expresión ectodérmica.
- CXCL14 presenta una expresión no solapante y en muchos casos complementaria a la de SDF1, la única otra quimioquina con tan alta conservación evolutiva. Es especialmente llamativa la alta complementariedad de ambas tanto en la extremidad de ratón como en la de pollo.
- La sobreexpresión de CXCL14 en el mesénquima de la extremidad de vertebrados no afecta a la expresión de marcadores específicos de precursores de tendones y de músculo, y tampoco al crecimiento de la vasculatura en las condiciones experimentales desarrolladas en esta tesis.
- El factor de transcripción Prdm16 se expresa en la placa lateral mesodérmica, en la zona prospectiva de la extremidad anterior, antes de la inducción de la extremidad, y por todo el mesénquima de esta estructura durante la embriogénesis. Además, esta proteína se expresa también de manera prominente en el mesénquima craneofacial y tejido nervioso.
- Los ratones mutantes Prdm16 <sup>-/-</sup> poseen defectos craneofaciales y en el tronco arterial del corazón compatibles con un defecto en Cresta Neural.

- Los ratones mutantes *Prdm16* <sup>-/-</sup> poseen defectos en los elementos proximales de la extremidad (escápula y clavícula) compatibles con un papel en la formación de patrón en su eje proximodistal.
- La pérdida de función del factor de transcripción PRDM16 provoca agénesis de la parte medial de la clavícula, que, en contraposición con la parte lateral de osificación membranosa, se forma por osificación endocondral.
- Estudios histológicos de marcadores específicos de hueso y cartílago, demuestran que la clavícula tiene un programa de condrogénesis y osteogénesis especial que no se observan en ningún otro hueso del cuerpo, y que su parte medial se desarrolla a partir de un cartílago primario.



# **Apéndices**



## **Apéndice de los resultados:**

### **Antecedentes bibliográficos de los genes analizados del experimento de Microarrays**

#### ***AIGP3/Serinc5***

Es una proteína transportadora que pertenece a una familia de 5 miembros (serinc1-5) cuya función es incorporar un aminoácido de serina a determinados lípidos, como la fosfatidil Serina y los esfingolípidos, que posteriormente se integran en la membrana celular. Los cinco miembros se expresan en el cerebro (descrito en rata), pero sólo serinc5 se encuentra enriquecido en las vainas de mielina (Inuzuka et al., 2005).

#### ***Cbln1(precerebelina1)***

La proteína madura es un hexadecapéptido perteneciente a la superfamilia del C1q/TNF(*Tumor Necrosis Factor*). En ratón existen 4 cerebelinas que forman complejos homoméricos y heteroméricos. La Cbln1 es secretada por las células granulares del cerebelo, y regula las sinapsis excitatorias entre los axones de estas células (fibras paralelas) y las células de Purkinje, junto con la Cbln3 y el receptor de glutamato delta2 (GluRdelta2) (Iijima et al., 2009; Miura et al., 2009).

Los ratones mutantes para esta proteína tienen una reducción severa de las sinapsis entre estas células y una desregulación de su actividad neuronal (Miura et al., 2009; Yuzaki, 2009).

#### ***Epithelial membrane protein1 (Emp1)***

Glicoproteína de membrana que pertenece a la familia de la PMP22 (*peripheral membrane protein22*) junto con otros dos miembros en ratón, EMP2 y EMP3. Esta proteína se expresa en tejidos con alta proliferación celular como zonas de neurogénesis en el cerebro, en desarrollo de tumores, y en células madre embrionarias. También se ha visto que EMP1 es una diana de cMyc durante la tumorigénesis (Ben-Porath et al., 1998). Se encuentra formando parte de las uniones ocluyentes celulares en la barrera hematoencefálica (Bangsow et al., 2008). No se ha descrito función en la extremidad.

#### ***Integral membrane protein 2a (Itm2a)***

Proteína integral de membrana con un dominio Brichos en el N-terminal. Pertenece a una familia de proteínas de membrana que consta de otros dos miembros ITM2B e ITM2C en ratón; esta última se expresa específicamente en el cerebro (Choi et al., 2001).

ITM2A está implicada en las etapas tempranas de la condrogénesis y se expresa en los condrocitos proliferativos y no proliferativos (*resting chondrocytes*) de los huesos lagos y está ausente en los hipertróficos (Tuckermann et al., 2000; Van den Plas and Merregaert, 2004). También se ha comprobado que es capaz de inducir miogénesis “in vitro” (Van den Plas and Merregaert, 2004).

### ***Lrig1***

Glicoproteína integral de membrana con un dominio extracelular rico en leucinas y tres dominios tipo inmunoglobulina (Suzuki et al., 1996). Se expresa en las células basales de la epidermis y en las células que recubren el folículo piloso; Los ratones deficientes para esta proteína presentan un tipo de hiperplasia en la piel (Suzuki et al., 2002). Se ha visto que Lrig1 se comporta como un regulador negativo de la vía del EGFR promoviendo su degradación (Gur G et al., 2004). Un estudio reciente demuestra que Lrig1 es un marcador de una población de células multipotentes epidérmicas que se encuentran dentro del folículo piloso y responden a estímulos mitógenos de cMyc; Lrig1 actúa como diana de cMyc en este contexto, antagonizando la acción de éste (Jensen et al., 2009).

***Hypothetical fibronectin type III domain containing protein:*** no descrita

### ***Fragilis 2/Ifitm1 (Interferon induced transmembrane protein 1)***

Es un miembro de la familia de proteínas Fragilis. Los genes que codifican para estas proteínas tienen elementos de respuesta para el interferón (ISREs) y su expresión está asociada con la especificación de la línea germinal (Lange et al., 2003). Sólo se ha descrito su patrón de expresión en el embrión temprano (hasta E8,5 dpc), donde se detecta en el mesodermo paraxial y lateral, así como en el primer somito formado. El *knock down* tiene defectos en somitogénesis. En cuanto a su regulación, esta proteína es uno de los factores inducidos por la vía de Wnt en embriogénesis (Lickert et al., 2005).

***Putative transmembrane protein (TMP) RIKENC DNA9030408N13*** no descrita

### ***Neuropilina 2 (Nrp2)***

Glicoproteína de membrana que actúa como co-receptor de semaforinas de clase III y de algunos miembros de la familia de los factores de crecimiento vascular (VEGFs). Las semaforinas se unen a complejos de receptores neuropilina-plexina; En cambio, la señalización del VEGF se produce a través de la unión de neuropilinas con los receptores del factor de crecimiento vascular (VEGFRs).

La neuropilina2 se expresa en axones del sistema nervioso central y periférico y en células endoteliales.

Los ratones deficientes para esta proteína tienen defectos en algunas proyecciones nerviosas y en pequeños vasos linfáticos y capilares sanguíneos (Yuan et al., 2002). En relación con esto último, recientemente se ha descrito su implicación en la linfangiogénesis a través de su interacción con el VEGFR3 (Xu et al., 2010). Otra de sus funciones es dirigir a las células de cresta neural troncal a la parte anterior de los somitos para formar los ganglios de las raíces dorsales (Schwarz et al., 2009).

### ***COUP-TF1/Nr2f1***

Pertenece a la familia de receptores nucleares; se induce por ácido retinoico y regula la transcripción del receptor de estrógenos mediante interacción proteína-proteína y por la unión competitiva a EREs (*estrogen response elements*) (Klinge et al., 1997). Esta proteína tiene un papel fundamental en el desarrollo del SNC. Una de sus funciones es la especificación de las neuronas sensoriales del cortex parietal y occipital frente a las partes motoras del cortex frontal (Armentano et al., 2007). Los ratones deficientes para esta proteína, además de tener extendida la parte motora del cortex frente a la sensorial, tienen defectos en las proyecciones talámico corticales, debido a la pérdida de progenitores corticales, importantes para guiar las fibras talámicas a la capa IV del cortex (Zhou et al., 1999). No se ha descrito función en el desarrollo de la extremidad.

### ***Slitrk6***

Proteína transmembrana homóloga al factor de crecimiento axonal SLIT en su extremo N-terminal, y homóloga a los receptores de la neurotrofina en su extremo C-terminal. El patrón de expresión en el embrión de ratón ha sido previamente caracterizado y engloba las siguientes estructuras: vesícula ótica, epidermis de la parte lateral del cuerpo y mesénquima subyacente, SNC, extremidades, proceso maxilar, arcos faríngeos, cóclea, retina, primordio de los dientes, lengua y en los primordios de intestino, pulmón, páncreas y extremidades. Su expresión en el SNC se restringe a la parte dorsal del tálamo, cerebelo y médula (Aruga, 2003).

Los defectos mostrados por los ratones deficientes en esta proteína en las inervaciones cocleares, demuestran su implicación en la inervación y supervivencia de las neuronas sensoriales del oído interno (Katayama et al., 2009).

### ***Periostin (Pstn)/Osteoblast specific factor (Osf2)/Runx2***

Factor de transcripción fundamental en el proceso de osteogénesis (Ducy et al., 1997).

Los ratones que carecen de esta proteína tienen ausencia total de hueso y los heterocigotos poseen retraso en la osificación de algunos huesos craneales y una hipoplasia de la clavícula (Otto et al., 1997)

### ***Plexin A2***

Proteína de membrana que actúa como correceptor de Semaforinas junto con la neuropilina.

Está implicada en migración axonal, función que lleva a cabo mediante la unión de la Sema3A que se comporta como un quimiorrepelente (Rohm et al., 2000).

Otra de sus funciones es la de asegurar la correcta migración de las células de la cresta neural cardíaca hacia el tracto de salida del corazón (Toyofuku et al., 2008).

### ***Wnt1-inducible-signalling pathway protein( Wisp1)***

Proteína secretada perteneciente a la familia CNN (*cysteine rich 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed*)

Esta familia se caracteriza por tener 4 módulos ricos en cisteínas y por estar asociadas a la matriz extracelular. Los componentes de esta familia, y en concreto Wisp1, están implicados en la formación de cartílago y hueso (Inkson et al., 2008).

Wisp1 es uno de los factores inducidos por la vía de Wnt a través de la unión al DNA del factor de transcripción CREB. Se ha visto que induce tumorigénesis y es capaz de suprimir la apoptosis mediada por p53 tras un daño en el DNA (Su et al., 2002).

En estadios tardíos (E13,5-15,5), se expresa en las articulaciones, en el pericondrio y en el periostio de la extremidad del ratón (Witte et al., 2009).

***Prdm16:*** mirar introducción

***CXCL14:*** mirar introducción.

# **Bibliografía**





- Agace, W. W., Amara, A., Roberts, A. I., Pablos, J. L., Thelen, S., Uguccioni, M., Li, X. Y., Marsal, J., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T. et al. (2000) 'Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation', *Current biology : CB* 10(6): 325-8.
- Agarwal, P., Wylie, J. N., Galceran, J., Arkhitko, O., Li, C., Deng, C., Grosschedl, R. and Bruneau, B. G. (2003) 'Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo', *Development* 130(3): 623-33.
- Aguilo, F., Avagyan, S., Labar, A. S., Sevilla, A., Lee, D. F., Kumar, P., Lemischka, I. R., Zhou, B. Y. and Snoeck, H. W. (2011) 'Prdm16 is a physiological regulator of hematopoietic stem cells', *Blood*.
- Ahn, K., Mishina, Y., Hanks, M. C., Behringer, R. R. and Crenshaw, E. B., 3rd (2001) 'BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb', *Development* 128(22): 4449-61.
- Altshuler, M., Clarke, J. D. and Tickle, C. (1997) 'Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb', *Development* 124(22): 4547-56.
- Ambler, C. A., Nowicki, J. L., Burke, A. C. and Bautch, V. L. (2001) 'Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts', *Developmental biology* 234(2): 352-64.
- Amthor, H., Christ, B., Weil, M. and Patel, K. (1998) 'The importance of timing differentiation during limb muscle development', *Current biology : CB* 8(11): 642-52.
- Armentano, M., Chou, S. J., Tomassy, G. S., Leingartner, A., O'Leary, D. D. and Studer, M. (2007) 'COUP-TFI regulates the balance of cortical patterning between frontal/motor and sensory areas', *Nature neuroscience* 10(10): 1277-86.
- Arques, C. G., Doohan, R., Sharpe, J. and Torres, M. (2007) 'Cell tracing reveals a dorsoventral lineage restriction plane in the mouse limb bud mesenchyme', *Development* 134(20): 3713-22.
- Aruga, J. (2003) 'Slitrk6 expression profile in the mouse embryo and its relationship to that of Nlrr3', *Gene expression patterns : GEP* 3(6): 727-33.
- Azcoitia, V., Aracil, M., Martinez, A. C. and Torres, M. (2005) 'The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo', *Developmental biology* 280(2): 307-20.
- Bagri, A., Gurney, T., He, X., Zou, Y. R., Littman, D. R., Tessier-Lavigne, M. and Pleasure, S. J. (2002) 'The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells', *Development* 129(18): 4249-60.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M. and Bachelier, F. (2005) 'The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes', *J Biol Chem* 280(42): 35760-6.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V. and Tabin, C. J. (2006) 'Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis', *PLoS genetics* 2(12): e216.
- Bangsow, T., Baumann, E., Bangsow, C., Jaeger, M. H., Pelzer, B., Gruhn, P., Wolf, S., von Melchner, H. and Stanimirovic, D. B. (2008) 'The epithelial membrane protein 1 is a novel tight junction protein of the blood-brain barrier', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28(6): 1249-60.
- Barrow, J. R., Thomas, K. R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M. R. and McMahon, A. P. (2003) 'Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge', *Genes & development* 17(3): 394-409.
- Bastida, M. F. and Ros, M. A. (2008) 'How do we get a perfect complement of digits?', *Current opinion in genetics & development* 18(4): 374-80.
- Bell, S. M., Schreiner, C. M. and Scott, W. J. (1998) 'The loss of ventral ectoderm identity correlates with the inability to form an AER in the legless hindlimb bud', *Mechanisms of development* 74(1-2): 41-50.

- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Waclaw, R. R., Campbell, K., Potter, S. S. and Scott, W. J. (2003) 'Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(21): 12195-200.
- Ben-Porath, I., Kozak, C. A. and Benvenisty, N. (1998) 'Chromosomal mapping of Tmp (Emp1), Xmp (Emp2), and Ymp (Emp3), genes encoding membrane proteins related to Pmp22', *Genomics* 49(3): 443-7.
- Berkes, C. A., Bergstrom, D. A., Penn, B. H., Seaver, K. J., Knoepfler, P. S. and Tapscott, S. J. (2004) 'Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential', *Molecular cell* 14(4): 465-77.
- Beverdam, A., Brouwer, A., Reijnen, M., Korving, J. and Meijlink, F. (2001) 'Severe nasal clefting and abnormal embryonic apoptosis in Alx3/Alx4 double mutant mice', *Development* 128(20): 3975-86.
- Beverdam, A. and Meijlink, F. (2001) 'Expression patterns of group-I aristaless-related genes during craniofacial and limb development', *Mechanisms of development* 107(1-2): 163-7.
- Bialek, P., Kern, B., Yang, X., Schrock, M., Sosic, D., Hong, N., Wu, H., Yu, K., Ornitz, D. M., Olson, E. N. et al. (2004) 'A twist code determines the onset of osteoblast differentiation', *Developmental cell* 6(3): 423-35.
- Bjork, B. C., Turbe-Doan, A., Prysak, M., Herron, B. J. and Beier, D. R. (2010) 'Prdm16 is required for normal palatogenesis in mice', *Human molecular genetics* 19(5): 774-89.
- Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q. and Raz, E. (2008) 'Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration', *Cell* 132(3): 463-73.
- Boulet, A. M. and Capecchi, M. R. (2004) 'Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod', *Development* 131(2): 299-309.
- Boulet, A. M., Moon, A. M., Arenkiel, B. R. and Capecchi, M. R. (2004) 'The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth', *Developmental biology* 273(2): 361-72.
- Bouwman, P. and Philipsen, S. (2002) 'Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors', *Molecular and cellular endocrinology* 195(1-2): 27-38.
- Brand-Saberi, B., Gamel, A. J., Krenn, V., Muller, T. S., Wilting, J. and Christ, B. (1996a) 'N-cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud', *Developmental biology* 178(1): 160-73.
- Brand-Saberi, B., Muller, T. S., Wilting, J., Christ, B. and Birchmeier, C. (1996b) 'Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo', *Developmental biology* 179(1): 303-8.
- Brand-Saberi, B., Seifert, R., Grim, M., Wilting, J., Kuhlewein, M. and Christ, B. (1995) 'Blood vessel formation in the avian limb bud involves angioblastic and angiotrophic growth', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 202(2): 181-94.
- Brand-Saberi, B., Wilting, J., Ebersperger, C. and Christ, B. (1996c) 'The formation of somite compartments in the avian embryo', *The International journal of developmental biology* 40(1): 411-20.
- Brent, A. E., Schweitzer, R. and Tabin, C. J. (2003) 'A somitic compartment of tendon progenitors', *Cell* 113(2): 235-48.
- Brohmann, H., Jagla, K. and Birchmeier, C. (2000) 'The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells', *Development* 127(2): 437-45.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D. and Relaix, F. (2003) 'The formation of skeletal muscle: from somite to limb', *Journal of anatomy* 202(1): 59-68.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J. C. (2001) 'Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development', *Annual review of cell and developmental biology* 17: 87-132.

- Capellini, T. D., Di Giacomo, G., Salsi, V., Brendolan, A., Ferretti, E., Srivastava, D., Zappavigna, V. and Selleri, L. (2006) 'Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression', *Development* 133(11): 2263-73.
- Caplan, A. I. and Koutroupas, S. (1973) 'The control of muscle and cartilage development in the chick limb: the role of differential vascularization', *Journal of embryology and experimental morphology* 29(3): 571-83.
- Carmeliet, P. and Collen, D. (1999) 'Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development', *Current topics in microbiology and immunology* 237: 133-58.
- Carroll, S. B. (1995) 'Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates', *Nature* 376(6540): 479-85.
- Cohn, M. J. (2000) 'Developmental biology. Giving limbs a hand', *Nature* 406(6799): 953-4.
- Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte, J. C., Abud, H., Heath, J. K. and Tickle, C. (1995) 'Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos', *Cell* 80(5): 739-46.
- Cohn, M. J., Patel, K., Krumlauf, R., Wilkinson, D. G., Clarke, J. D. and Tickle, C. (1997) 'Hox9 genes and vertebrate limb specification', *Nature* 387(6628): 97-101.
- Chen, H. and Johnson, R. L. (1999) 'Dorsoventral patterning of the vertebrate limb: a process governed by multiple events', *Cell and tissue research* 296(1): 67-73.
- Chevallier A, Kieny M, Mauger A, Sengel P. (1977). 'Developmental fate of somatic mesoderm in the chick embryo'. In: Ede D, Hinchliffe JR, Balls M, editors. Vertebrate limb and somite morphogenesis. Cambridge: Cambridge University Press. p 421–432.
- Chevallier A, Kieny M. On the role of the connective tissue in the patterning of the chick limb musculature. *Dev. Genes Evol.* 1982;191:277–280.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M. P., Simandl, B. K., Li, Y., Beachy, P. A. and Fallon, J. F. (2001) 'Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function', *Developmental biology* 236(2): 421-35.
- Choe, S. K., Lu, P., Nakamura, M., Lee, J. and Sagerstrom, C. G. (2009) 'Meis cofactors control HDAC and CBP accessibility at Hox-regulated promoters during zebrafish embryogenesis', *Developmental cell* 17(4): 561-7.
- Choi, S. C., Kim, J., Kim, T. H., Cho, S. Y., Park, S. S., Kim, K. D. and Lee, S. H. (2001) 'Cloning and characterization of a type II integral transmembrane protein gene, Itm2c, that is highly expressed in the mouse brain', *Molecules and cells* 12(3): 391-7.
- Chuikov, S., Levi, B. P., Smith, M. L. and Morrison, S. J. (2010) 'Prdm16 promotes stem cell maintenance in multiple tissues, partly by regulating oxidative stress', *Nature cell biology* 12(10): 999-1006.
- Davey, M. G., James, J., Paton, I. R., Burt, D. W. and Tickle, C. (2007) 'Analysis of talpid3 and wild-type chicken embryos reveals roles for Hedgehog signalling in development of the limb bud vasculature', *Developmental biology* 301(1): 155-65.
- Delfini, M. C., Hirsinger, E., Pourquie, O. and Duprez, D. (2000) 'Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis', *Development* 127(23): 5213-24.
- Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B. and Birchmeier, C. (1999) 'The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle', *Development* 126(8): 1621-9.
- Dietrich, S., Schubert, F. R., Healy, C., Sharpe, P. T. and Lumsden, A. (1998) 'Specification of the hypaxial musculature', *Development* 125(12): 2235-49.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Koprunner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C. V., Leung, T. and Raz, E. (2002) 'Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1', *Cell* 111(5): 647-59.

- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G. (1997) 'Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation', *Cell* 89(5): 747-54.
- Dudley, A. T., Ros, M. A. and Tabin, C. J. (2002) 'A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development', *Nature* 418(6897): 539-44.
- Duprez, D., Fournier-Thibault, C. and Le Douarin, N. (1998) 'Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb', *Development* 125(3): 495-505.
- Edom-Vovard, F. and Duprez, D. (2004) 'Signals regulating tendon formation during chick embryonic development', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 229(3): 449-57.
- Eichmann, A., Yuan, L., Moyon, D., Lenoble, F., Pardanaud, L. and Breant, C. (2005) 'Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks', *The International journal of developmental biology* 49(2-3): 259-67.
- Epstein, J. A., Shapiro, D. N., Cheng, J., Lam, P. Y. and Maas, R. L. (1996) 'Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(9): 4213-8.
- Eshkar-Oren, I., Viukov, S. V., Salameh, S., Krief, S., Oh, C. D., Akiyama, H., Gerber, H. P., Ferrara, N. and Zelzer, E. (2009) 'The forming limb skeleton serves as a signaling center for limb vasculature patterning via regulation of Vegf', *Development* 136(8): 1263-72.
- Estella, C. and Mann, R. S. (2010) 'Non-redundant selector and growth-promoting functions of two sister genes, buttonhead and Sp1, in Drosophila leg development', *PLoS genetics* 6(6): e1001001.
- Fallon, J. F., Lopez, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B. and Simandl, B. K. (1994) 'FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development', *Science* 264(5155): 104-7.
- Fang, J. and Hall, B. K. (1997) 'Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteal', *Anatomy and embryology* 196(5): 349-62.
- Feinberg, R. N. and Beebe, D. C. (1983) 'Hyaluronate in vasculogenesis', *Science* 220(4602): 1177-9.
- Feinberg, R. N. and Noden, D. M. (1991) 'Experimental analysis of blood vessel development in the avian wing bud', *The Anatomical record* 231(1): 136-44.
- Feinberg, R. N., Repo, M. A. and Saunders, J. W., Jr. (1983) 'Ectodermal control of the avascular zone of the peripheral mesoderm in the chick embryo', *The Journal of experimental zoology* 226(3): 391-8.
- Fernandez-Teran, M. and Ros, M. A. (2008) 'The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways', *The International journal of developmental biology* 52(7): 857-71.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. and Moore, M. W. (1996) 'Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene', *Nature* 380(6573): 439-42.
- Ficara, F., Murphy, M. J., Lin, M. and Cleary, M. L. (2008) 'Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence', *Cell stem cell* 2(5): 484-96.
- Flanagan-Steet, H., Hannon, K., McAvoy, M. J., Hullinger, R. and Olwin, B. B. (2000) 'Loss of FGF receptor 1 signaling reduces skeletal muscle mass and disrupts myofiber organization in the developing limb', *Developmental biology* 218(1): 21-37.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. and Hurle, J. M. (1996) 'Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod', *Development* 122(8): 2349-57.

Garcia-Andres, C. and Torres, M. (2010) 'Comparative expression pattern analysis of the highly conserved chemokines SDF1 and CXCL14 during amniote embryonic development', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239(10): 2769-77.

Gardner, E. (1968) 'The embryology of the clavicle', *Clinical orthopaedics and related research* 58: 9-16.

Geduspan, J. S. and MacCabe, J. A. (1986) 'Evidence for the transmission of dorsoventral information to the ectoderm during the earliest stages of limb development', *Progress in clinical and biological research* 226: 115-26.

Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Prols, F., Patel, K., Scaal, M., Huang, R. and Christ, B. (2005) 'Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis', *Developmental biology* 288(1): 221-33.

Gerrits, H., van Ingen Schenau, D. S., Bakker, N. E., van Disseldorp, A. J., Strik, A., Hermens, L. S., Koenen, T. B., Krajnc-Franken, M. A. and Gossen, J. A. (2008) 'Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice', *Genesis* 46(5): 235-45.

Gilbert S.R., "Developmental Biology" 7ª edición.

Giordani, J., Bajard, L., Demignon, J., Daubas, P., Buckingham, M. and Maire, P. (2007) 'Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27): 11310-5.

Grieshammer, U., Minowada, G., Pisenti, J. M., Abbott, U. K. and Martin, G. R. (1996) 'The chick limbless mutation causes abnormalities in limb bud dorsal-ventral patterning: implications for the mechanism of apical ridge formation', *Development* 122(12): 3851-61.

Grifone, R., Demignon, J., Houbroun, C., Souil, E., Niro, C., Seller, M. J., Hamard, G. and Maire, P. (2005) 'Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo', *Development* 132(9): 2235-49.

Grim, M. and Wachtler, F. (1991) 'Muscle morphogenesis in the absence of myogenic cells', *Anatomy and embryology* 183(1): 67-70.

Guha, U., Gomes, W. A., Kobayashi, T., Pestell, R. G. and Kessler, J. A. (2002) 'In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb', *Developmental biology* 249(1): 108-20.

Hall, B. K. (1986) 'The role of movement and tissue interactions in the development and growth of bone and secondary cartilage in the clavicle of the embryonic chick', *Journal of embryology and experimental morphology* 93: 133-52.

Hall, B. K. (2001) 'Development of the clavicles in birds and mammals', *The Journal of experimental zoology* 289(3): 153-61.

Hall, B. K. and Miyake, T. (2000) 'All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22(2): 138-47.

Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. and Tabin, C. J. (2004) 'Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities', *Cell* 118(4): 517-28.

Hasson, P., Del Buono, J. and Logan, M. P. (2007) 'Tbx5 is dispensable for forelimb outgrowth', *Development* 134(1): 85-92.

Hasson, P., DeLaurier, A., Bennett, M., Grigorieva, E., Naiche, L. A., Papaioannou, V. E., Mohun, T. J. and Logan, M. P. (2010) 'Tbx4 and tbx5 acting in connective tissue are required for limb muscle and tendon patterning', *Developmental cell* 18(1): 148-56.

Hinchliffe, J. R. and Ede, D. A. (1968) 'Abnormalities in bone and cartilage development in the talpid mutant of the fowl', *Journal of embryology and experimental morphology* 19(3): 327-39.

- Hromas, R., Broxmeyer, H. E., Kim, C., Nakshatri, H., Christopherson, K., 2nd, Azam, M. and Hou, Y. H. (1999) 'Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells', *Biochem Biophys Res Commun* 255(3): 703-6.
- Huang, L. F., Fukai, N., Selby, P. B., Olsen, B. R. and Mundlos, S. (1997) 'Mouse clavicular development: analysis of wild-type and cleidocranial dysplasia mutant mice', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 210(1): 33-40.
- Huang, R., Zhi, Q., Patel, K., Wilting, J. and Christ, B. (2000) 'Dual origin and segmental organisation of the avian scapula', *Development* 127(17): 3789-94.
- Huang, S., Shao, G. and Liu, L. (1998) 'The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression', *The Journal of biological chemistry* 273(26): 15933-9.
- Hurle, J. M., Hinchliffe, J. R., Ros, M. A., Critchlow, M. A. and Genis-Galvez, J. M. (1989) 'The extracellular matrix architecture relating to myotendinous pattern formation in the distal part of the developing chick limb: an ultrastructural, histochemical and immunocytochemical analysis', *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists* 27(2): 103-20.
- Hurle, J. M., Ros, M. A., Ganan, Y., Macias, D., Critchlow, M. and Hinchliffe, J. R. (1990) 'Experimental analysis of the role of ECM in the patterning of the distal tendons of the developing limb bud', *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists* 30(2): 97-108.
- Iijima, T., Emi, K. and Yuzaki, M. (2009) 'Activity-dependent repression of Cbln1 expression: mechanism for developmental and homeostatic regulation of synapses in the cerebellum', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(17): 5425-34.
- Infantino, S., Moepps, B. and Thelen, M. (2006) 'Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells', *Journal of immunology* 176(4): 2197-207.
- Inkson, C. A., Ono, M., Kuznetsov, S. A., Fisher, L. W., Robey, P. G. and Young, M. F. (2008) 'TGF-beta1 and WISP-1/CCN-4 can regulate each other's activity to cooperatively control osteoblast function', *Journal of cellular biochemistry* 104(5): 1865-78.
- Inuzuka, M., Hayakawa, M. and Ingi, T. (2005) 'Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis', *The Journal of biological chemistry* 280(42): 35776-83.
- Izukuri, K., Suzuki, K., Yajima, N., Ozawa, S., Ito, S., Kubota, E. and Hata, R. I. 'Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell xenografts', *Transgenic Res*.
- Jensen, K. B., Collins, C. A., Nascimento, E., Tan, D. W., Frye, M., Itami, S. and Watt, F. M. (2009) 'Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis', *Cell stem cell* 4(5): 427-39.
- Jonk, L. J., de Jonge, M. E., Pals, C. E., Wissink, S., Vervaart, J. M., Schoorlemmer, J. and Kruijer, W. (1994) 'Cloning and expression during development of three murine members of the COUP family of nuclear orphan receptors', *Mechanisms of development* 47(1): 81-97.
- Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Asakura, A., Tapscott, S. J. and Rudnicki, M. A. (1997) 'MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle', *Development* 124(23): 4729-38.
- Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M. P., Ruas, J. L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M. A. and Spiegelman, B. M. (2008) 'Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex', *Genes & development* 22(10): 1397-409.
- Kardon, G. (1998) 'Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb', *Development* 125(20): 4019-32.
- Kardon, G., Harfe, B. D. and Tabin, C. J. (2003) 'A Tcf4-positive mesodermal population provides a prepattern for vertebrate limb muscle patterning', *Developmental cell* 5(6): 937-44.

- Karsenty, G. and Wagner, E. F. (2002) 'Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development', *Developmental cell* 2(4): 389-406.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V. and Tajbakhsh, S. (2004) 'Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice', *Nature* 431(7007): 466-71.
- Katayama, K., Zine, A., Ota, M., Matsumoto, Y., Inoue, T., Fritsch, B. and Aruga, J. (2009) 'Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of Slitrk6-deficient mice', *PLoS one* 4(11): e7786.
- Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C. and Izpisua Belmonte, J. C. (2001) 'WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo', *Cell* 104(6): 891-900.
- Kawakami, Y., Esteban, C. R., Matsui, T., Rodriguez-Leon, J., Kato, S. and Izpisua Belmonte, J. C. (2004) 'Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos', *Development* 131(19): 4763-74.
- Kessel, M. and Gruss, P. (1991) 'Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid', *Cell* 67(1): 89-104.
- Kim, J., Irvine, K. D. and Carroll, S. B. (1995) 'Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing Drosophila wing', *Cell* 82(5): 795-802.
- Kimmel, R. A., Turnbull, D. H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C. A. and Joyner, A. L. (2000) 'Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation', *Genes & development* 14(11): 1377-89.
- Klein, R. S., Rubin, J. B., Gibson, H. D., DeHaan, E. N., Alvarez-Hernandez, X., Segal, R. A. and Luster, A. D. (2001) 'SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells', *Development* 128(11): 1971-81.
- Klinge, C. M., Silver, B. F., Driscoll, M. D., Sathya, G., Bambara, R. A. and Hilf, R. (1997) 'Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor interacts with estrogen receptor, binds to estrogen response elements and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression', *The Journal of biological chemistry* 272(50): 31465-74.
- Kontges, G. and Lumsden, A. (1996) 'Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny', *Development* 122(10): 3229-42.
- Kraus, P., Fraidenraich, D. and Loomis, C. A. (2001) 'Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling', *Mechanisms of development* 100(1): 45-58.
- Kronenberg, H. M. (2003) 'Developmental regulation of the growth plate', *Nature* 423(6937): 332-6.
- Kuijper, S., Beverdam, A., Kroon, C., Brouwer, A., Candille, S., Barsh, G. and Meijlink, F. (2005) 'Genetics of shoulder girdle formation: roles of Tbx15 and aristaless-like genes', *Development* 132(7): 1601-10.
- Kurokawa, M., Mitani, K., Irie, K., Matsuyama, T., Takahashi, T., Chiba, S., Yazaki, Y., Matsumoto, K. and Hirai, H. (1998) 'The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3', *Nature* 394(6688): 92-6.
- Kurth, I., Willmann, K., Schaerli, P., Hunziker, T., Clark-Lewis, I. and Moser, B. (2001) 'Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAF) in macrophage development', *J Exp Med* 194(6): 855-61.
- Lange, U. C., Saitou, M., Western, P. S., Barton, S. C. and Surani, M. A. (2003) 'The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice', *BMC developmental biology* 3: 1.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O. E., Yeo, C. Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U. K., Fallon, J. F. and Tabin, C. (1997) 'Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation', *Nature* 386(6623): 366-73.

- Lazarini, F., Tham, T. N., Casanova, P., Arenzana-Seisdedos, F. and Dubois-Dalcq, M. (2003) 'Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system', *Glia* 42(2): 139-48.
- Lewandoski, M., Sun, X. and Martin, G. R. (2000) 'Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development', *Nature genetics* 26(4): 460-3.
- Lickert, H., Cox, B., Wehrle, C., Taketo, M. M., Kemler, R. and Rossant, J. (2005) 'Dissecting Wnt/beta-catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos', *Development* 132(11): 2599-609.
- Litingtung, Y., Dahn, R. D., Li, Y., Fallon, J. F. and Chiang, C. (2002) 'Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity', *Nature* 418(6901): 979-83.
- Long, Q., Quint, E., Lin, S. and Ekker, M. (2000) 'The zebrafish scyba gene encodes a novel CXC-type chemokine with distinctive expression patterns in the vestibulo-acoustic system during embryogenesis', *Mechanisms of development* 97(1-2): 183-6.
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M. and Joyner, A. L. (1996) 'The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning', *Nature* 382(6589): 360-3.
- Loomis, C. A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J. and Joyner, A. L. (1998) 'Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs', *Development* 125(6): 1137-48.
- Lopez-Martinez, A., Chang, D. T., Chiang, C., Porter, J. A., Ros, M. A., Simandl, B. K., Beachy, P. A. and Fallon, J. F. (1995) 'Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage', *Current biology : CB* 5(7): 791-6.
- Lu, M. F., Cheng, H. T., Kern, M. J., Potter, S. S., Tran, B., Diekwisch, T. G. and Martin, J. F. (1999) 'prx-1 functions cooperatively with another paired-related homeobox gene, prx-2, to maintain cell fates within the craniofacial mesenchyme', *Development* 126(3): 495-504.
- Lu, P., Minowada, G. and Martin, G. R. (2006) 'Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function', *Development* 133(1): 33-42.
- Mallo M, Schrewe H, Martin JF, Olson EN, Ohnemus S. 2000. 'Assembling a functional tympanic membrane: signals from the external acoustic meatus coordinate development of the malleal manubrium'. *Development* 127:4127–4136.
- Mankoo, B. S., Collins, N. S., Ashby, P., Grigorieva, E., Pevny, L. H., Candia, A., Wright, C. V., Rigby, P. W. and Pachnis, V. (1999) 'Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development', *Nature* 400(6739): 69-73.
- Mann, R. K. and Beachy, P. A. (2004) 'Novel lipid modifications of secreted protein signals', *Annual review of biochemistry* 73: 891-923.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P. and Martin, G. R. (2008) 'Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning', *Nature* 453(7193): 401-5.
- Martin, G. R. (1998) 'The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs', *Genes & development* 12(11): 1571-86.
- Matsuoka, T., Ahlberg, P. E., Kessar, N., Iannarelli, P., Dennehy, U., Richardson, W. D., McMahon, A. P. and Koentges, G. (2005) 'Neural crest origins of the neck and shoulder', *Nature* 436(7049): 347-55.
- McGonnell, I. M., McKay, I. J. and Graham, A. (2001) 'A population of caudally migrating cranial neural crest cells: functional and evolutionary implications', *Developmental biology* 236(2): 354-63.
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL, Martinez AC (2001) 'Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways'. *EMBO J* 20:2497–2507.
- Mellado, M., Serrano, A., Martinez, C. and Rodriguez-Frade, J. M. (2006) 'G protein-coupled receptor dimerization and signaling', *Methods Mol Biol* 332: 141-57.



- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martinez, C. and Torres, M. (1999) 'Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth', *Nature* 402(6760): 425-9.
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M. E., Martinez, A. C., Ros, M. A. and Torres, M. (2000) 'Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes', *Development* 127(18): 3961-70.
- Meuter, S. and Moser, B. (2008) 'Constitutive expression of CXCL14 in healthy human and murine epithelial tissues', *Cytokine* 44(2): 248-55.
- Meuter, S., Schaerli, P., Roos, R. S., Brandau, O., Bosl, M. R., von Andrian, U. H. and Moser, B. (2007) 'Murine CXCL14 is dispensable for dendritic cell function and localization within peripheral tissues', *Molecular and cellular biology* 27(3): 983-92.
- Michaud, J. L., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M. (1997) 'The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure', *Development* 124(8): 1453-63.
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M. and Simonet, W. S. (1998) 'Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless', *Genes & development* 12(20): 3156-61.
- Miura, E., Matsuda, K., Morgan, J. I., Yuzaki, M. and Watanabe, M. (2009) 'Cbln1 accumulates and colocalizes with Cbln3 and GluRdelta2 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the mouse cerebellum', *The European journal of neuroscience* 29(4): 693-706.
- Molyneaux, K. A., Zinszner, H., Kunwar, P. S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M. J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C. et al. (2003) 'The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival', *Development* 130(18): 4279-86.
- Moon, A. M. and Capecchi, M. R. (2000) 'Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs', *Nature genetics* 26(4): 455-9.
- Moran, J. L., Levorse, J. M. and Vogt, T. F. (1999) 'Limbs move beyond the radical fringe', *Nature* 399(6738): 742-3.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N. et al. (2001) 'Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis', *Nature* 410(6824): 50-6.
- Mundlos, S. (1999) 'Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics', *Journal of medical genetics* 36(3): 177-82.
- Murchison, N. D., Price, B. A., Conner, D. A., Keene, D. R., Olson, E. N., Tabin, C. J. and Schweitzer, R. (2007) 'Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons', *Development* 134(14): 2697-708.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. and Kishimoto, T. (1996) 'Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1', *Nature* 382(6592): 635-8.
- Naiche, L. A. and Papaioannou, V. E. (2003) 'Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois', *Development* 130(12): 2681-93.
- Nara, N., Nakayama, Y., Okamoto, S., Tamura, H., Kiyono, M., Muraoka, M., Tanaka, K., Taya, C., Shitara, H., Ishii, R. et al. (2007) 'Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance', *J Biol Chem* 282(42): 30794-803.
- Narita, T., Nishimatsu, S., Wada, N. and Nohno, T. (2007) 'A Wnt3a variant participates in chick apical ectodermal ridge formation: distinct biological activities of Wnt3a splice variants in chick limb development', *Development, growth & differentiation* 49(6): 493-501.

- Nasser, M. W., Raghuwanshi, S. K., Grant, D. J., Jala, V. R., Rajarathnam, K. and Richardson, R. M. (2009) 'Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer', *Journal of immunology* 183(5): 3425-32.
- Nesbitt, S. J., Turner, A. H., Spaulding, M., Conrad, J. L. and Norell, M. A. (2009) 'The theropod furcula', *Journal of morphology* 270(7): 856-79.
- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P. and Dolle, P. (2002) 'Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse', *Development* 129(15): 3563-74.
- Nimmagadda, S., Geetha-Loganathan, P., Scaal, M., Christ, B. and Huang, R. (2007) 'FGFs, Wnts and BMPs mediate induction of VEGFR-2 (Quek-1) expression during avian somite development', *Developmental biology* 305(2): 421-9.
- Nimmagadda, S., Geetha Loganathan, P., Huang, R., Scaal, M., Schmidt, C. and Christ, B. (2005) 'BMP4 and noggin control embryonic blood vessel formation by antagonistic regulation of VEGFR-2 (Quek1) expression', *Developmental biology* 280(1): 100-10.
- Nimmagadda, S., Loganathan, P. G., Wilting, J., Christ, B. and Huang, R. (2004) 'Expression pattern of VEGFR-2 (Quek1) during quail development', *Anatomy and embryology* 208(3): 219-24.
- Nishikata, I., Sasaki, H., Iga, M., Tateno, Y., Imayoshi, S., Asou, N., Nakamura, T. and Morishita, K. (2003) 'A novel EVI1 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation', *Blood* 102(9): 3323-32.
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G. R. and Tickle, C. (1994) 'A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb', *Nature* 371(6498): 609-12.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I. and Martin, G. R. (1993) 'FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb', *Cell* 75(3): 579-87.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R. et al. (1997) 'Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development', *Cell* 89(5): 765-71.
- Ozawa, S., Kato, Y., Kubota, E. and Hata, R. (2009a) 'BRAC/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse', *Biomedical research* 30(5): 315-8.
- Ozawa, S., Kato, Y., Kubota, E. and Hata, R. (2009b) 'BRAC/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse', *Biomed Res* 30(5): 315-8.
- Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y. and Lewandoski, M. (2007) 'BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling', *Development* 134(12): 2359-68.
- Pardanaud, L. and Dieterlen-Lievre, F. (1995) 'Does the paraxial mesoderm of the avian embryo have hemangioblastic capacity?', *Anatomy and embryology* 192(4): 301-8.
- Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L. M., Catala, M. and Dieterlen-Lievre, F. (1996) 'Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis', *Development* 122(5): 1363-71.
- Park, B. Y., Hong, C. S., Sohail, F. A. and Saint-Jeannet, J. P. (2009) 'Developmental expression and regulation of the chemokine CXCL14 in Xenopus', *The International journal of developmental biology* 53(4): 535-40.
- Parr, B. A. and McMahon, A. P. (1995) 'Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb', *Nature* 374(6520): 350-3.
- Pearson, J. C., Lemons, D. and McGinnis, W. (2005) 'Modulating Hox gene functions during animal body patterning', *Nature reviews. Genetics* 6(12): 893-904.
- Pizette, S. and Niswander, L. (1999) 'BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge', *Development* 126(5): 883-94.

- Pudliszewski, M. and Pardanaud, L. (2005) 'Vasculogenesis and angiogenesis in the mouse embryo studied using quail/mouse chimeras', *The International journal of developmental biology* 49(2-3): 355-61.
- Qu, S., Tucker, S. C., Ehrlich, J. S., Levorse, J. M., Flaherty, L. A., Wisdom, R. and Vogt, T. F. (1998) 'Mutations in mouse *Aristaless-like4* cause Strong's luxoid polydactyly', *Development* 125(14): 2711-21.
- Qu, S., Tucker, S. C., Zhao, Q., deCrombrughe, B. and Wisdom, R. (1999) 'Physical and genetic interactions between *Alx4* and *Cart1*', *Development* 126(2): 359-69.
- Rallis, C., Bruneau, B. G., Del Buono, J., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Nissim, S., Tabin, C. J. and Logan, M. P. (2003) 'Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth', *Development* 130(12): 2741-51.
- Rancourt, D. E., Tsuzuki, T. and Capecchi, M. R. (1995) 'Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation', *Genes & development* 9(1): 108-22.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. and Tabin, C. (1993) 'Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA', *Cell* 75(7): 1401-16.
- Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J. W., De La Pena, J., Foy, B., Eshelman, B. and Izpisua Belmonte, J. C. (1997) 'Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb', *Nature* 386(6623): 360-6.
- Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M. and Puschel, A. W. (2000) 'Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A', *Mechanisms of development* 93(1-2): 95-104.
- Ronning, O. and Kantomaa, T. (1988) 'The growth pattern of the clavicle in the rat', *Journal of anatomy* 159: 173-9.
- Ros, M. A., Dahn, R. D., Fernandez-Teran, M., Rashka, K., Caruccio, N. C., Hasso, S. M., Bitgood, J. J., Lancman, J. J. and Fallon, J. F. (2003) 'The chick oligozeugodactyly (*ozd*) mutant lacks sonic hedgehog function in the limb', *Development* 130(3): 527-37.
- Ros, M. A., Lopez-Martinez, A., Simandl, B. K., Rodriguez, C., Izpisua Belmonte, J. C., Dahn, R. and Fallon, J. F. (1996) 'The limb field mesoderm determines initial limb bud anteroposterior asymmetry and budding independent of sonic hedgehog or apical ectodermal gene expressions', *Development* 122(8): 2319-30.
- Ros, M. A., Rivero, F. B., Hinchliffe, J. R. and Hurle, J. M. (1995) 'Immunohistological and ultrastructural study of the developing tendons of the avian foot', *Anatomy and embryology* 192(6): 483-96.
- Rosenbloom, J., Abrams, W. R. and Mecham, R. (1993) 'Extracellular matrix 4: the elastic fiber', *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7(13): 1208-18.
- Rot-Nikcevic, I., Downing, K. J., Hall, B. K. and Kablar, B. (2007) 'Development of the mouse mandibles and clavicles in the absence of skeletal myogenesis', *Histology and histopathology* 22(1): 51-60.
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J. M., Maroteaux, P., Le Merrer, M. and Munnich, A. (1994) 'Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia', *Nature* 371(6494): 252-4.
- Rubin, L. and Saunders, J. W., Jr. (1972) 'Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: constancy and temporal limits of the ectodermal induction', *Developmental biology* 28(1): 94-112.
- Ruhrberg, C. (2003) 'Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25(11): 1052-60.
- Salogni, L., Musso, T., Bosisio, D., Mirolo, M., Jala, V. R., Haribabu, B., Locati, M. and Sozzani, S. (2009) 'Activin A induces dendritic cell migration through the polarized release of CXC chemokine ligands 12 and 14', *Blood* 113(23): 5848-56.
- Sato, K., Koizumi, Y., Takahashi, M., Kuroiwa, A. and Tamura, K. (2007) 'Specification of cell fate along the proximal-distal axis in the developing chick limb bud', *Development* 134(7): 1397-406.

- Saunders, J. W., Jr. (1948) 'The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm', *The Journal of experimental zoology* 108(3): 363-403.
- Saunders JW Jr, Gasseling MT. 1968. 'Ectoderm-mesenchyma interaction in the origins of wing symmetry. In Epithelial-mesenchymal interactions' (ed. R. Fleischmajer, R.E. Billingham), 78-97. Williams Wilkins, Baltimore.
- Saunders, J. W., Jr. and Reuss, C. (1974) 'Inductive and axial properties of prospective wing-bud mesoderm in the chick embryo', *Developmental biology* 38(1): 41-50.
- Schaerli, P., Willmann, K., Ebert, L. M., Walz, A. and Moser, B. (2005) 'Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation', *Immunity* 23(3): 331-42.
- Schafer, K. and Braun, T. (1999) 'Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h', *Nature genetics* 23(2): 213-6.
- Scherz, P. J., Harfe, B. D., McMahon, A. P. and Tabin, C. J. (2004) 'The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells', *Science* 305(5682): 396-9.
- Scherz, P. J., McGlinn, E., Nissim, S. and Tabin, C. J. (2007) 'Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb', *Developmental biology* 308(2): 343-54.
- Schneider, R. A. (1999) 'Neural crest can form cartilages normally derived from mesoderm during development of the avian head skeleton', *Developmental biology* 208(2): 441-55.
- Schwarz, Q., Maden, C. H., Davidson, K. and Ruhrberg, C. (2009) 'Neuropilin-mediated neural crest cell guidance is essential to organise sensory neurons into segmented dorsal root ganglia', *Development* 136(11): 1785-9.
- Schweitzer, R., Chyung, J. H., Murtaugh, L. C., Brent, A. E., Rosen, V., Olson, E. N., Lassar, A. and Tabin, C. J. (2001) 'Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments', *Development* 128(19): 3855-66.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H. et al. (2008) 'PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch', *Nature* 454(7207): 961-7.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. et al. (1999) 'Fgf10 is essential for limb and lung formation', *Nature genetics* 21(1): 138-41.
- Selever, J., Liu, W., Lu, M. F., Behringer, R. R. and Martin, J. F. (2004) 'Bmp4 in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development', *Developmental biology* 276(2): 268-79.
- Selleri, L., Depew, M. J., Jacobs, Y., Chanda, S. K., Tsang, K. Y., Cheah, K. S., Rubenstein, J. L., O'Gorman, S. and Cleary, M. L. (2001) 'Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation', *Development* 128(18): 3543-57.
- Shellenberger, T. D., Wang, M., Gujrati, M., Jayakumar, A., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Ioannides, C. G., Efferson, C. L., El-Naggar, A. K., Roberts, D. et al. (2004) 'BRAC/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells', *Cancer Res* 64(22): 8262-70.
- Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M. et al. (2007) 'Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(37): 14759-64.
- Smith, M. M. and Hall, B. K. (1990) 'Development and evolutionary origins of vertebrate skeletogenic and odontogenic tissues', *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 65(3): 277-373.
- Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., Mishina, Y., Behringer, R. R., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B., 3rd and Birchmeier, W. (2003) 'Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb', *Genes & development* 17(16): 1963-8.

- Stadler, H. S., Higgins, K. M. and Capecchi, M. R. (2001). 'Loss of Ephreceptor expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in Hoxa13 mutant limbs'. *Development* **128**, 4177-4188.
- Stebler, J., Spieler, D., Slanchev, K., Molyneaux, K. A., Richter, U., Cojocaru, V., Tarabykin, V., Wylie, C., Kessel, M. and Raz, E. (2004) 'Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12', *Dev Biol* **272**(2): 351-61.
- Su, F., Overholtzer, M., Besser, D. and Levine, A. J. (2002) 'WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase', *Genes & development* **16**(1): 46-57.
- Summerbell, D., Lewis, J. H. and Wolpert, L. (1973) 'Positional information in chick limb morphogenesis', *Nature* **244**(5417): 492-6.
- Sun, X., Mariani, F. V. and Martin, G. R. (2002) 'Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development', *Nature* **418**(6897): 501-8.
- Suzuki, Y., Miura, H., Tanemura, A., Kobayashi, K., Kondoh, G., Sano, S., Ozawa, K., Inui, S., Nakata, A., Takagi, T. et al. (2002) 'Targeted disruption of LIG-1 gene results in psoriasiform epidermal hyperplasia', *FEBS letters* **521**(1-3): 67-71.
- Suzuki, Y., Sato, N., Tohyama, M., Wanaka, A. and Takagi, T. (1996) 'cDNA cloning of a novel membrane glycoprotein that is expressed specifically in glial cells in the mouse brain. LIG-1, a protein with leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains', *The Journal of biological chemistry* **271**(37): 22522-7.
- Swartz, M. E., Eberhart, J., Pasquale, E. B. and Krull, C. E. (2001) 'EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb', *Development* **128**(23): 4669-80.
- Tabin, C. and Wolpert, L. (2007) 'Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era', *Genes & development* **21**(12): 1433-42.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S. et al. (1998) 'The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract', *Nature* **393**(6685): 591-4.
- Tanaka, M., Tamura, K., Noji, S., Nohno, T. and Ide, H. (1997) 'Induction of additional limb at the dorsal-ventral boundary of a chick embryo', *Developmental biology* **182**(1): 191-203.
- Tarchini, B., Duboule, D. and Kmita, M. (2006) 'Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity', *Nature* **443**(7114): 985-8.
- te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H. J., Meijlink, F. and Zeller, R. (2002) 'Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3', *Science* **298**(5594): 827-30.
- Timmons, P. M., Wallin, J., Rigby, P. W. and Balling, R. (1994) 'Expression and function of Pax 1 during development of the pectoral girdle', *Development* **120**(10): 2773-85.
- Towers, M., Mahood, R., Yin, Y. and Tickle, C. (2008) 'Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning', *Nature* **452**(7189): 882-6.
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Yamamoto, M., Makino, N., Takamatsu, H., Takegahara, N., Suto, F., Hori, M., Fujisawa, H. et al. (2008) 'Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells', *Developmental biology* **321**(1): 251-62.
- Tozer, S., Bonnin, M. A., Relaix, F., Di Savino, S., Garcia-Villalba, P., Coumailleau, P. and Duprez, D. (2007) 'Involvement of vessels and PDGFB in muscle splitting during chick limb development', *Development* **134**(14): 2579-91.
- Tozer, S. and Duprez, D. (2005) 'Tendon and ligament: development, repair and disease', *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* **75**(3): 226-36.

- Treichel, D., Schock, F., Jackle, H., Gruss, P. and Mansouri, A. (2003) 'mBtd is required to maintain signaling during murine limb development', *Genes & development* 17(21): 2630-5.
- Tuckermann, J. P., Pittois, K., Partridge, N. C., Merregaert, J. and Angel, P. (2000) 'Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse', *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15(7): 1257-65.
- Van den Plas, D. and Merregaert, J. (2004) 'In vitro studies on Itm2a reveal its involvement in early stages of the chondrogenic differentiation pathway', *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96(6): 463-70.
- Vargesson, N., Clarke, J. D., Vincent, K., Coles, C., Wolpert, L. and Tickle, C. (1997) 'Cell fate in the chick limb bud and relationship to gene expression', *Development* 124(10): 1909-18.
- Vasyutina, E. and Birchmeier, C. (2006) 'The development of migrating muscle precursor cells', *Anatomy and embryology* 211 Suppl 1: 37-41.
- Vasyutina, E., Stebler, J., Brand-Saberi, B., Schulz, S., Raz, E. and Birchmeier, C. (2005a) 'CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells', *Genes & development* 19(18): 2187-98.
- Vasyutina, E., Stebler, J., Brand-Saberi, B., Schulz, S., Raz, E. and Birchmeier, C. (2005b) 'CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells', *Genes Dev* 19(18): 2187-98.
- Verheyden, J. M. and Sun, X. (2008) 'An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth', *Nature* 454(7204): 638-41.
- Wang, C. K., Omi, M., Ferrari, D., Cheng, H. C., Lizarraga, G., Chin, H. J., Upholt, W. B., Dealy, C. N. and Kosher, R. A. (2004) 'Function of BMPs in the apical ectoderm of the developing mouse limb', *Developmental biology* 269(1): 109-22.
- Warner, D. R., Horn, K. H., Mudd, L., Webb, C. L., Greene, R. M. and Pisano, M. M. (2007) 'PRDM16/MEL1: a novel Smad binding protein expressed in murine embryonic orofacial tissue', *Biochimica et biophysica acta* 1773(6): 814-20.
- Wilkinson DG, Nieto MA. 1993. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* 225:361–373.
- Wilson, D. (1983) 'The origin of the endothelium in the developing marginal vein of the chick wing-bud', *Cell differentiation* 13(1): 63-7.
- Wiltling, J., Brand-Saberi, B., Huang, R., Zhi, Q., Kontges, G., Ordahl, C. P. and Christ, B. (1995) 'Angiogenic potential of the avian somite', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 202(2): 165-71.
- Witte, F., Dokas, J., Neuendorf, F., Mundlos, S. and Stricker, S. (2009) 'Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation', *Gene expression patterns : GEP* 9(4): 215-23.
- Wolpert, L. (1969) 'Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation', *Journal of theoretical biology* 25(1): 1-47.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P. and Deng, C. (1998) 'Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction', *Development* 125(4): 753-65.
- Xu, Y., Yuan, L., Mak, J., Pardanaud, L., Caunt, M., Kasman, I., Larrivee, B., Del Toro, R., Suchting, S., Medvinsky, A. et al. (2010) 'Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3', *The Journal of cell biology* 188(1): 115-30.

- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A. et al. (1997) 'Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb', *Development* 124(21): 4393-404.
- Yang, Y. and Niswander, L. (1995) 'Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning', *Cell* 80(6): 939-47.
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Breant, C., Karkkainen, M. J., Alitalo, K. and Eichmann, A. (2002) 'Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice', *Development* 129(20): 4797-806.
- Yokouchi, Y., Nakazato, S., Yamamoto M., Goto, Y., Kameda, T., Iba, H. and Kuroiwa, A. (1995). 'Misexpression of *Hoxa13* induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds'. *Genes Dev.* 9, 2509-2522.
- Yusuf, F., Rehim, R., Morosan-Puopolo, G., Dai, F., Zhang, X. and Brand-Saberi, B. (2006) 'Inhibitors of CXCR4 affect the migration and fate of CXCR4+ progenitors in the developing limb of chick embryos', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235(11): 3007-15.
- Yuzaki, M. (2009) 'New (but old) molecules regulating synapse integrity and plasticity: Cbln1 and the delta2 glutamate receptor', *Neuroscience* 162(3): 633-43.
- Zeller, R., Lopez-Rios, J. and Zuniga, A. (2009) 'Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis', *Nature reviews. Genetics* 10(12): 845-58.
- Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A. P., Flavell, R. A. and Williams, T. (1996) 'Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2', *Nature* 381(6579): 238-41.
- Zhou, C., Qiu, Y., Pereira, F. A., Crair, M. C., Tsai, S. Y. and Tsai, M. J. (1999) 'The nuclear orphan receptor COUP-TFI is required for differentiation of subplate neurons and guidance of thalamocortical axons', *Neuron* 24(4): 847-59.
- Zhu, J., Nakamura, E., Nguyen, M. T., Bao, X., Akiyama, H. and Mackem, S. (2008) 'Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud', *Developmental cell* 14(4): 624-32.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I. and Littman, D. R. (1998) 'Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development', *Nature* 393(6685): 595-9.
- Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P. and Zeller, R. (1999) 'Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds', *Nature* 401(6753): 598-602.





# **Artículos**

# **publicados**

